

DIE ENTWICKLUNG DES PHOTOSYNTHESEAPPARATES
DER PIGMENTMUTANTE C- 6D VON SCENEDESMUS OBLIQUUS
UNTER BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG DER ROLLE DER
LICHTABHÄNGIG GEBILDETEN CAROTINOIDE

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr.rer.nat.)
vorgelegt dem Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

von

GERNOT STRASSBERGER
aus Potsdam

Marburg/Lahn 1976

1977
-

DIE ENTWICKLUNG DES PHOTOSYNTHESEAPPARATES
DER PIGMENTMUTANTE C- 6D VON SCENEDESMUS OBLIQUUS
UNTER BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG DER ROLLE DER
LICHTABHÄNGIG GEBILDETEN CAROTINOIDE

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr.rer.nat.)
vorgelegt dem Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg/Lahn



von

GERNOT STRASSBERGER

aus Potsdam

Marburg/Lahn 1976



Von dem Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg/Lahn als Dissertation angenommen
am 20.12.1976

Tag der mündlichen Prüfung: 13.1.1977

Berichterstatter: Prof. Dr. H. Senger

Mitberichterstatter: Prof. Dr. H. Follmann

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. <u>Einleitung und Problemstellung</u>	1
1.1. Kurze Darstellung des Photosyntheseprozesses	1
1.2. Die Carotinoide	4
1.2.1. Verbreitung der Carotinoide in der Natur	4
1.2.2. Carotinoide in Grünalgen	4
1.2.3. Struktur der Carotinoide und Biosynthese	5
1.2.4. Funktionen der Carotinoide in Photosyntheseorganismen	6
1.2.4.1. Schutzfunktion	6
1.2.4.1.1. Abhängigkeit des Schutzes von der Chromophorenlänge	6
1.2.4.1.2. Mechanismen der Schutzwirkung	8
1.2.4.2. Akzessorische Pigmente	10
1.2.4.3. Beteiligung an Vorgängen im Photosyntheseprozess, deren Funktion noch diskutiert wird.	12
1.2.4.3.1. Absorptionsänderungen	12
1.2.4.3.2. Reversible Xanthophyllumwandlungen	13
1.2.5. Carotinoide in Photosynthese-Reaktionszentren	14
1.2.6. Problemstellung und Ziel	18
2. <u>Methodik</u>	
2.1. Objekt und Anzucht	22
2.2. Bestimmung von Wachstumsparametern und Bezugsgrößen	23
2.3. Isolierung, Identifizierung und quantitative Bestimmung der Pigmente	24
2.3.1. Isolierung der Pigmente	24
2.3.2. Identifizierung der Pigmente	26
2.3.3. Quantitative Bestimmung der Pigmente	27

2.4.	Photosynthetische Sauerstoffmes- sungen	27
2.5.	Messung des Quantenbedarfs	29
2.6.	Herstellung zellfreier Systeme	29
2.7.	Messung von Photosystem II-Aktivi- tät	31
2.8.	Messung von Photosystem I-Aktivität	32
2.9.	Herstellung und Trennung von Chloro- plasten-Subpartikeln im Saccharose- Dichtegradienten	33
2.10.	Spektroskopie von Algen und Par- tikeln	34
2.11.	Fluoreszenzmessungen	35
2.12.	Hemmung der Carotinoid-Synthese	36
3.	<u>Ergebnisse und Diskussion</u>	37
3.1.	Charakterisierung der heterotrophen Dunkelkultur	37
3.1.1.	Wachstumsparameter	37
3.1.2.	Chlorophyll während des Dunkel- wachstums	40
3.1.3.	Pigmentzusammensetzung	40
3.2.	Verhalten der Kultur nach Überfü- rung in Licht ("Ergrünung")	43
3.2.1.	Wachstumsparameter	43
3.2.2.	Pigmente während der Ergrünung	45
3.2.2.1.	Chlorophylle	45
3.2.2.2.	Carotinoide	48
3.2.2.3.	Zwischenbilanz	
3.2.3.	Entwicklung der Photosynthesereak- tionen	59
3.2.3.1.	Reaktionen ganzer Zellen	59
3.2.3.1.1.	Photosynthese und p-Benzochinon- Hill-Reaktion	59
3.2.3.1.2.	Fluoreszenzinduktion (Kautsky- Effekt)	67
3.2.3.1.2.1.	Die Fluoreszenzinduktionskurve	67

3.2.3.1.2.2.	Veränderungen in der Fluoreszenzinduktionskurve während der Ergrünung	70
3.2.3.1.3.	Quantenbedarf	74
3.2.3.1.4.	Atmung	77
3.2.3.2.	Reaktionen von zellfreien Systemen	78
3.2.3.2.1.	Reaktionen von PS I	78
3.2.3.2.2.	Reaktionen von PS II	82
3.2.4.	Entwicklung der Struktur	86
3.2.4.1.	Methoden der Chlorophyllfraktionierung	86
3.2.4.2.	Entwicklung der Banden im Saccharose-Gradienten	87
3.2.4.3.	Reaktionen der Partikelfraktion	89
3.2.4.4.	Pigmentzusammensetzung der Gradienten-Fraktionen	93
3.2.4.5.	Absorptions- und Fluoreszenzspektroskopische Charakterisierung der Banden	96
3.2.4.6.	Folgerungen aus der Auftrennung der Chloroplasten-Subpartikel	113
3.3.	Photosynthesereaktionen und Struktur nach Hemmung der Zyklisierungsreaktion der Carotinoide mit Nicotin	114
3.3.1.	Nicotin als Zyklisierungshemmstoff	114
3.3.2.	Auswirkungen verschiedener Nicotin-Konzentrationen auf Wachstumsparameter, Reaktionen und Pigmentsynthese der Scenedesmus-Mutante C-6D	115
3.3.2.1.	Wachstumsparameter und Reaktionen.	115
3.3.2.2.	Pigmente	119
3.3.2.2.1.	Abhängigkeit der Pigmentzusammensetzung von der Nikotinkonzentration	119

3.3.2.2.2.	Nachweis der Photooxydation des Chlorophylls	121
3.3.2.3.	Reaktion von Chloroplastenpartikeln	126
3.3.3.	Untersuchung der Struktur	129
3.3.3.1.	Fraktionen im Saccharose-Gradienten und Reaktionen	129
3.4.	Photosynthesereaktionen und Struktur bei Unterdrückung der Xanthophyllsynthese	136
3.4.1.	Wachstum und Reaktionen	136
3.4.2.	Pigmente	138
3.4.3.	Struktur	138
3.4.3.1.	Fraktionen im Saccharose-Gradienten, Reaktionen und spektroskopische Eigenschaften	141
3.4.3.2.	Spektroskopische Charakterisierung der Banden	142
4.	<u>Schlußfolgerungen</u>	151
5.	<u>Zusammenfassung</u>	157
6.	<u>Nomenklatur der Carotinoide</u>	160
7.	<u>Literatur</u>	163

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Abkürzungen verwendet:

ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
Asc.	Ascorbat
Chl a	Chlorophyll a
Chl b	Chlorophyll b
Cyt b ₅₅₉	Cytochrom b ₅₅₉
Cyt b ₅₆₃	Cytochrom b ₅₆₃
Cyt f	Cytochrom f (Cytochrom c ₅₅₄)
DEMB	2,5-Dibrom-3-methyl-6-isopropyl-p-benzochinon
DCMU	3-(3,4-dichlorphenyl)-1, 1-Dimethylharnstoff
DPC	Diphenylcarbazid
E' ₀	Redoxpotential bei pH=7
EDTA	Dinatriumsalz der Äthylendiamintetraessigsäure
MeV	Methylviologen
NADP	Nikotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat
P ₇₀₀	Chlorophyll a _I im Reaktionszentrum von Photosystem I
P ₆₈₀	Chlorophyll a _{II} im Reaktionszentrum von Photosystem II
p-BQ	p-Benzochinon
PCV	packed cell volume (dichtest gepacktes Zellvolumen)
PS I	Photosystem I
PS II	Photosystem II
Q	Quencher, Primärakzeptor von Photosystem II
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
X, P ₄₃₀	Primärakzeptor von Photosystem I

Digitized by the Internet Archive
in 2026

1. Einleitung und Problemstellung

1.1. Kurze Darstellung des Photosynthese- prozesses

Im Photosyntheseprozess der grünen Pflanzen wird Lichtenergie in chemische Energie umgewandelt, wobei es zur Bildung energiereicher Kohlenhydrate kommt. Der Gesamt Ablauf kann in den durch die Lichtreaktionen geprägten Teil, in dem unter Wasserspaltung und Sauerstoff freisetzung ATP und Reduktionsäquivalente in Form von $\text{NADPH} + \text{H}^+$ gebildet werden und die Dunkelreaktionen des Calvin-Zyklus, in denen CO_2 -Fixierung und der Aufbau energiereicher Kohlenhydrate unter Verbrauch von ATP und $\text{NADPH} + \text{H}^+$ stattfinden, unterteilt werden. Das folgende Schema gibt einen Überblick über den durch die Lichtreaktionen geprägten Teil der Reaktionskette, wobei insbesondere auch die Beteiligung der Pigmente an diesem Prozess berücksichtigt ist.

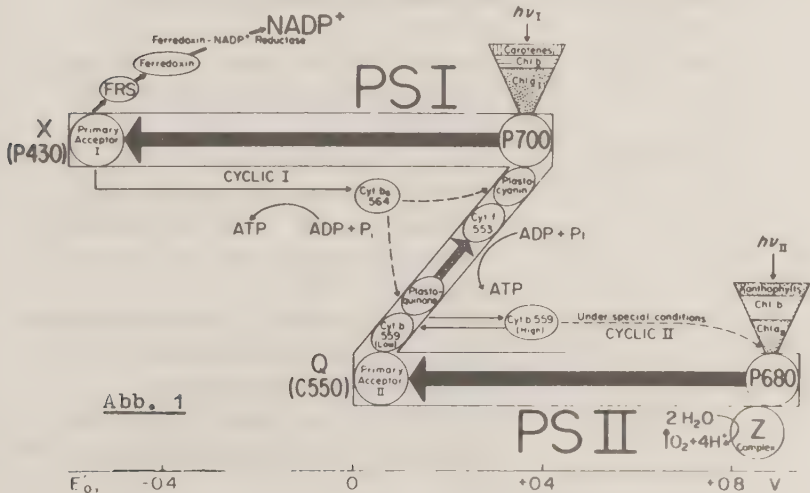


Abb. 1: Das Z-Schema des Elektronentransportes in der Photosynthese. Die dicken horizontalen Pfeile repräsentieren die zwei Lichtreaktionen, alle anderen Pfeile stehen für die Dunkelreaktionen. Der Elektronenfluß von H_2O auf $NADP^+$ wird als "nicht-zyklischer" Elektronenfluß bezeichnet, der vom Primärakzeptor von Photosystem I (PS I) zu den Intermediaten der Elektronentransportkette zwischen beiden Photosystemen (Plastochinon oder Plastocyanin) als zyklischer Elektronenfluß von PS I (cyclic I).

Möglicherweise existiert ein ähnlicher zyklischer Elektronenfluß um PS II, der als zyklischer Elektronenfluß von PS II (cyclic II) bezeichnet werden könnte.

E'_0 :	ist das Redox-Potential der im Folgenden vorgestellten Reaktionspartner und -Systeme bei pH7 in Volt.
Z-complex:	das Elektronendonorsystem für PS II;
P 680	das angenommene Reaktionszentrum von PS II;
Chl a_{II} :	Massen-Chlorophyll a von PS II
Chl b :	Chlorophyll b;
Cyt b_{559} :	Cytochrom b mit einer seiner verschiedenen Absorptionsbanden bei 559 nm;
Q (C 550):	Elektronenakzeptor von PS II; Q steht für den Quencher der Chl a_{II} -Fluoreszenz und C 550 für eine Verbindung mit einer Absorptionsänderung bei 550 nm;
ADP, ATP, P_i	Adenosindiphosphat, Adenosintriphosphat, anorganisches Phosphat in entsprechender Reihenfolge;
Cyt f_{553} :	Cytochrom f mit einer seiner verschiedenen Absorptionsbanden bei 553 nm;

- P 700 : das aktive Reaktionszentrum von PS I
- Chl a_I : Massen-Chlorophyll a von PS I
- Cyt b_6 564 : Cytochrom b_6 mit einer seiner verschiedenen Absorptionsbanden bei 564 nm;
- X (P 430): der Elektronenakzeptor von PS I (ein Pigment mit einer seiner verschiedenen Absorptionsbanden bei 430 nm);
- FRS: Ferredoxin-reduzierende Substanz;
- $h\nu_1$ $h\nu_2$: die von den jeweiligen Photosystemen hauptsächlich absorbierten Lichtqualitäten;
- Carotine, Chl b, Chl a_I : angenommene Verteilung der Pigmente in der "Sammelfalle" von PS I (Antennenpigmente)
- Xanthophylle, Chl b, Chl a_{II} : Angenommene Verteilung der Pigmente in der "Sammelfalle" von PS II (Antennenpigmente)

Das Schema wurde übernommen aus GOVINDJEE (1975).

1.2. Die Carotinoide

1.2.1. Verbreitung der Carotinoide in der Natur

Carotinoide sind gelb und orange-rot gefärbte Pigmente, die in lebenden Organismen vorkommen. Unter der Vielzahl der in der belebten Natur vorkommenden Pigmente sind die Carotinoide mit am weitesten verbreitet. Sie werden sowohl im Tier- als auch im Pflanzenreich gefunden. "De novo" synthetisiert werden Carotinoide jedoch nur von Bakterien, Pilzen, Algen und Höheren Pflanzen (GOODWIN T.W., 1976). Die in etlichen Tiergruppen gefundenen, zum Teil charakteristischen, Carotinoide stammen aus der enzymatischen Umwandlung der mit der Nahrung aufgenommenen pflanzlichen Carotinoide.

1.2.2. Carotinoide in Grünalgen

Das Carotinoid-Muster von Grünalgen und Höheren Pflanzen ist sehr ähnlich und im Vergleich zu anderen Algengruppen relativ einheitlich (HAGER und STRANSKY, 1970 b).

In den Grünalgen sind folgende Carotinoide zu finden: Hauptcarotine sind α - und β -Carotin; bei Chara und Pedinomonas wurde auch noch γ -Carotin gefunden. Als Xanthophylle sind Lutein, Zeaxanthin, Antheraxanthin, Violaxanthin und Neoxanthin unter normalen Kulturbedingungen zu finden.

Unter Mangelbedingungen werden von einigen Algen sog. Sekundärcarotinoide gebildet, wobei es sich um Keto-Derivate des β -Carotins handelt (DERSCH, 1960; CZYGAN, 1968). Sekundärcarotinoide treten jedoch, im Gegensatz zu den o. gen., unter "Nicht-Mangel-Bedingungen" vorhandenen Carotinoiden, extra-plastidär auf.

1.2.3. Struktur der Carotinoide und Biosynthese

Chemisch gesehen gehört die größte Gruppe der Carotinoide zu den Tetraterpenen. Man kann sie sich formal aus 8 Isopren-Untereinheiten aufgebaut vorstellen. Der symmetrische Aufbau des Moleküls resultiert aus dem letzten Schritt im Biosyntheseweg, in welchem durch "tail to tail"-Kondensation zweier C_{20} -Einheiten das typische C_{40} -Skelett der Carotinoide gebildet wird. Dieses erste Carotinoid-Molekül im Biosyntheseweg, Phytoen, enthält in seinem Zentrum drei konjugierte Doppelbindungen. Durch schrittweise Dehydrierung wird das System konjugierter Doppelbindungen um jeweils 2 pro Dehydrierungsschritt bis zur Maximalzahl von 11 im Lycopin erweitert. Die Carotinoide mit 3- und 5 konjugierten Doppelbindungen (Phytoen und Phytofluene) absorbieren ausschließlich kurzwelliges UV-Licht und erscheinen somit ungefärbt. 5-Carotin, das 7 konjugierte Doppelbindungen im Molekül enthält, ist aufgrund seiner in den sichtbaren Bereich des Spektrums ausgedehnten Absorption das erste gefärbte Carotinoid im Syntheseweg. Lycopin, das 11 konjugierte Doppelbindungen im Molekül enthält und im gesamten kurzwelligen Bereich des Spektrums bis ins Grün absorbiert, erscheint daher orangerot gefärbt.

Lycopin scheint der Vorläufer aller in Algen zu findenden Carotinoide zu sein (GOODWIN, 1974). Seine Schlüsselstellung im Biosyntheseweg beruht unter anderem darauf, daß es Substrat für die Zyklisierungsreaktion der Carotinoide ist, als deren Endprodukte α - und β -Carotin gebildet werden.

Durch Einbau von Sauerstoff in das reine Kohlenwasserstoffskelett der Carotine werden die Xanthophylle gebildet. Obwohl es bereits seit geraumer Zeit eine Reihe indirekter Beweise dafür gibt, daß Carotine (bei Grünalgen α - und β -Carotin)

(s. u.a. CLAES, 1959) als Ausgangsverbindungen für die Synthese der Xanthophylle dienen, gelang der direkte Beweis durch Markierungsexperimente erst vor kurzer Zeit an einem Flavobakterium (DAVIES, 1975).

1.2.4. Funktionen der Carotinoide in Photosynthese-Organismen

Wie schon einleitend bemerkt, können die Carotinoide neben den von den Porphyrinen abgeleiteten Pigmenten als die in der belebten Natur weitestverbreiteten Pigmente angesehen werden. In diesem Faktum spiegelt sich ihre grundlegende biologische Bedeutung wider. Die heute bekannten Funktionen der Carotinoide sind eng verknüpft mit ihrer Eigenschaft als Farbstoffe, Licht zu absorbieren. Als wichtigste Funktionen werden ihnen zugeschrieben:

- Schutz der photoautotrophen Organismen vor Photo-oxidationen
- Wirkung als akzessorische Pigmente der Photosynthese

Ferner sind sie an weiteren, mit der Photosynthese gekoppelten Vorgängen beteiligt, deren Funktion noch diskutiert wird. Dies sind:

- Absorptionsänderungen
- Xanthophyllumwandlungen

1.2.4.1. Schutzfunktion

1.2.4.1.1. Abhängigkeit des Schutzes von der Chromophorenlänge

Wenn es eine als universell zu bezeichnende Funktion der Carotinoide gibt, so ist dies ihre Eigenschaft, Organismen vor dem schädigenden Einfluß von Licht in Gegenwart von Sauerstoff zu schützen. Diese

Eigenschaft wurde erstmals von STANIERs Arbeitsgruppe (GRIFFITHS, SISTROM, COHEN-BAZIRE, STANIER, 1955) durch Untersuchungen an Mutanten der Purpurbakterie Rhodopseudomonas spheroides, die unfähig waren, gefärbte Carotinoide zu bilden, eindeutig belegt. Die Untersuchungen führten zur Postulierung, daß die Carotinoide universell in Photosynthese-Organismen vorkommen, da sie Zellen vor der Photodynamischen Zerstörung, welche durch Chlorophyll katalysiert wird, schützen.

Etwa zur gleichen Zeit berichtete CLAES (1954) über Chlorella vulgaris-Mutanten mit Defekten in der Carotinoidsynthese, die ebenfalls lichtempfindlich waren und bei Belichtung ausbleichten. Den Mutanten war gemeinsam, daß sie kein β -Carotin besaßen. Die folgenden in Klammern gesetzten Zahlen geben die Anzahl der konjugierten Doppelbindungen der einzelnen Moleküle an. Die Mutante 5/871 besaß nur Phytoen (3), Mutante 5/515 besaß Phytoen (3), Phytofluen (5) und ζ -Carotin (7). Mutante 9a besaß kein α -(10) und β -Carotin (11), jedoch Xanthophylle und ein als P 426 bezeichnetes Pigment, das wahrscheinlich β -Zeacarotin (9) ist, Mutante 5/520 besaß Phytoen (3), Phytofluen (5), ζ -Carotin (7), Proneurosporin (9) und Prolycopin (11).

In folgenden Untersuchungen stellten sowohl STANIER (1959) als auch CLAES und NAKAYAMA (1959) eine Beziehung zwischen Chromophorenlänge und Schutzwirkung der Carotinoide fest.

In vitro-Experimente, welche von CLAES und NAKAYAMA (1959) mit organischen Chlorophyll-Lösungen in Gegenwart von Carotinen mit unterschiedlicher Zahl konjugierter Doppelbindungen im Molekül durchgeführt wurden, führten zu dem Schluß, daß nur Carotinoide mit 9 bzw. 11 konjugierten Doppelbindungen einen effektiven Schutz gewährleisten konnten. STANIER (1959) kam zu den gleichen Ergebnissen bei in vivo Systemen.

1.2.4.1.2. Mechanismen der Schutzwirkung

FOOTE und WEXLER (1964) konnten die bereits von KAUTSKY (1931) vorgeschlagene Bildung und Beteiligung des singulett-angeregten Sauerstoffmoleküls (1O_2) an photosensibilisierten Oxidationen nachweisen. Nachdem FOOTE und DENNY (1968) und FOOTE, CHANG und DENNY (1970) zeigen konnten, daß 1O_2 durch Carotinoide effektiv gelöscht werden kann und diese Fähigkeit in gleicher Weise wie die biologische Schutzwirkung eine Funktion der Chromophorenlänge der Carotinoide ist, d.h. der biologischen Schutzwirkung parallel verläuft, werden im allgemeinen drei Mechanismen der Carotinoid-Schutzwirkung akzeptiert (s. KRINSKY, 1971 und BURNETT, 1976) (s. Abb. 2).

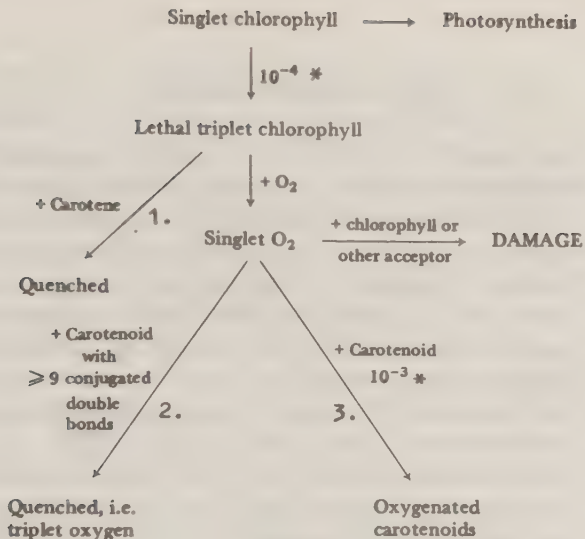


Abb. 2:

Schematische Übersicht über die möglichen Schutzmechanismen

1. Carotinoide können den angeregten Triplett-Zustand des Chlorophylls direkt löschen, so daß es erst gar nicht zur Bildung von 1O_2 kommt.
2. Carotinoide können den angeregten Singulett-Zustand des Sauerstoff-Moleküls löschen, wobei ihr Molekül nicht verändert wird.
3. In einer chemischen Reaktion zwischen 1O_2 und Carotinoiden entstehen höher oxidierte Carotinoide.

* Reaktionszeiten in sec.

(Das Schema wurde entnommen aus BURNETT, 1976)

1.2.4.2. Akzessorische Pigmente

Eine andere Funktion, die von Carotinoiden übernommen wird, ist die Ausdehnung der spektralen Empfindlichkeit des Photosyntheseapparates, ohne jedoch direkt an Photosynthesereaktionen beteiligt zu sein. Pigmente mit derartiger Funktion, zu denen auch die Phycobiliproteide und Chlorophyll b gezählt werden müssen, werden als akzessorische Pigmente bezeichnet.

Ob, und wenn ja, welche Pigmente als akzessorische Pigmente fungieren, läßt sich mit Hilfe von Aktionspektren feststellen, in welchen eine Reaktion des Organismus in Abhängigkeit der eingestrahnten Wellenlänge (Voraussetzung: gleiche Quantendichte) gemessen wird. Derartige Untersuchungen ergaben, daß einige Carotinoide mit Sicherheit in der Lage sind, absorbierte Lichtenergie auf die primär an der Photosynthese beteiligten Chlorophylle zu übertragen.

Am eindeutigsten konnte der Beweis der Energieübertragung auf Chlorophylle für Fucoxanthin, dem Hauptcarotinoid der Braunalgen und Diatomeen geführt werden. Der Beweis gelang bereits Ende des 19. Jahrhunderts dem Botaniker ENGELMANN (1884). Fucoxanthin verlängert die Absorption im blauen Teil zum grünen Bereich des Spektrums (bis 590 nm) weiter als alle anderen Carotinoide (GOVINDJEE und ZILINKAS BRAUN, 1974) und ist daher im Absorptionsspektrum und im Aktionsspektrum eindeutig auszumachen. Der Energietransfer ist sehr effektiv, was daraus hervorgeht, daß Licht, das von Fucoxanthin absorbiert wird, genauso effektiv in der Photosynthese ist, wie von Chlorophyll selbst absorbiertes Licht in Braunalgen (BLINKS, 1964).

Die Wirkung der Carotinoide als akzessorische Pigmente in Grünalgen und Höheren Pflanzen ist ebenfalls nachgewiesen (GOEDHEER, 1969). Der Nachweis ist jedoch wegen der anscheinend geringeren Effektivität der Energieübertragung sowie der Überlagerung mit dem Absorptionsbereich der Chlorophylle in vivo nicht immer leicht und eindeutig zu erbringen. Nach GOEDHEER (1970) soll β -Carotin neben Fucoxanthin das einzige Carotinoid sein, welches im in vivo-Absorptionsspektrum der Algen gesehen werden kann. Daraus müßte gefolgert werden, daß es auch als einziges Carotinoid außer Fucoxanthin als akzessorisches Pigment wirken kann.

THORNBUR (1975) isolierte aus verschiedenen Dinoflagellaten einen wasserlöslichen Peridinin-Chlorophyll a-Protein-Komplex, in dem eine sehr effektive Energieübertragung von Peridinin, dem Hauptxanthophyll der Peridineen, auf Chlorophyll a festgestellt werden konnte.

Während GOEDHEER (1969) an der Chlorophyll b-freien Alge Tribonema equale nachweisen konnte, daß Carotinoide absorbierte Lichtenergie auf Chlorophyll a übertragen, gibt es andere Befunde an Mutanten von Chlamydomonas reinhardtii (KOREN und EPEL, 1976), welche Chlorophyll b eine Rolle als Mediator für den Energietransfer von Carotinoiden auf Chlorophyll a zuschreiben.

Abschließend kann gesagt werden, daß die Rolle der Carotinoide als akzessorische Pigmente zwar erwiesen ist, daß jedoch eindeutige Belege darüber, welche Carotinoide in Grünalgen und Höheren Pflanzen ihre Anregungsenergie auf das Chlorophyll übertragen können, wie effektiv diese Übertragung ist, und welche Rolle möglicherweise Chlorophyll b spielt, noch weiterer Untersuchungen bedarf.

1.2.4.3. Beteiligung an Vorgängen im Photosyntheseprozess, deren Funktion noch diskutiert wird.

1.2.4.3.1. Absorptionsänderungen

Die prominentesten Phänomene, die mit der Aktivierung der Photosynthesereaktionen verbunden und bisher noch ungeklärt sind, sind die Absorptionsänderungen bei 520 und 550 nm.

a) der "520 change": Diese Absorptionsänderung, die bei Bestrahlung mit photosynthetisch aktivem Licht (meist oberhalb 620 nm) bei 515-520 nm auftritt, wird von einer Reihe von Autoren mit Carotinoiden in Verbindung gebracht (WOLFF und WITT, 1969, STRICHARTZ und CHANCE, 1972). Dem widersprechen jedoch Befunde von KULANDAIVELU und SENGGER (1976), worin gezeigt wird, daß die völlig Carotinoidfreie Mutante C-6E von Scenedesmus obliquus ebenfalls eine starke Absorptionsänderung bei 520 nm zeigt.

b) C₅₅₀ : Eine weitere lichtinduzierte Absorptionsänderung wurde 1959 von KNAFF und ARNON beschrieben und war seitdem Gegenstand einer Vielzahl von Untersuchungen. Als strukturelle Basis der Absorptionsänderung wurde eine Substanz C₅₅₀ postuliert, bei der "C" die Beteiligung eines Carotinoides impliziert. BUTLER et al. (1971) und OKAYAMA und BUTLER (1972) stellten bei Extraktions- und Rekonstitutionsexperimenten fest, daß Zugabe von β -Carotin zu Spinat-Chloroplasten, die vorher mit Hexan extrahiert worden waren und keine Ab-

sorptionsänderung bei 550 nm mehr zeigten, zu einer erneuten Ausbildung der Absorptionsänderung führten. Die Untersuchungen führten zu dem Schluß, daß C_{550} sehr nahe bei der Substanz Q, dem Primärakzeptor von Photosystem II lokalisiert, oder Q selbst sei (s. auch BEN HAYYIM und MALKIN, 1971).

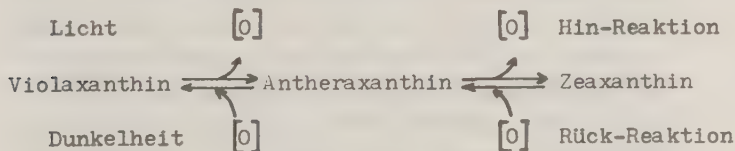
Dagegen kamen KATOH und KIMIMURA (1974) zu dem Schluß, daß C_{550} nicht mit Q identisch sei.

1.2.4.3.2. Reversible Xanthophyllumwandlungen

Grünalgen, Braunalgen, Moose, Farne und Samenpflanzen zeigen bei Belichtung Veränderungen im Mengenverhältnis der Xanthophylle Zeaxanthin, Antheraxanthin und Violaxanthin zueinander, welche als "reversible Xanthophyllumwandlungen" bezeichnet werden.

Ähnliche Veränderungen im Verhältnis bestimmter Xanthophylle zueinander sind noch in anderen Algenklassen zu finden, sollen jedoch hier nicht diskutiert werden.

Abb. 3: Schema des Epoxidzyklus



Mit einsetzender Belichtung läuft die Hin-Reaktion sehr rasch an und stellt sich nach 20-30 min auf ein von der Lichtintensität abhängiges Gleichgewichtsniveau mit der Rückreaktion ein.

Nach HAGER (1975) werden als Funktionen diskutiert:

1. Eine Beteiligung des Zyklus an der photosynthetischen Sauerstoffentwicklung (SAPOZNIKOV et al., 1961)
2. KRINSKY (1968) favorisiert die Hypothese, daß die reversiblen Xanthophyllumwandlungen als Schutzmechanismus in den Photosynthese-Organismen eine Rolle spielt.
3. Nach HAGER (1975) ist es wahrscheinlich, daß der Zyklus dazu dient, überschüssige Reduktionsäquivalente dem Photosyntheseprozess zu entziehen. Dabei wird einmal das Verhältnis von gebildetem ATP zu NADPH zugunsten des ATP verbessert. Andererseits wird dem photosynthetischen Elektronentransport bei Anlaufen der Reaktionen durch das Oxidieren der in Dunkelheit noch zu einem erheblichen Teil reduziert vorliegenden Redox-Pools eine Starthilfe geliefert.

1.2.5. Carotinoide in Photosynthese-Reaktionszentren

Die Fähigkeit der Carotinoide, Organismen vor photooxidativen Schädigungen zu schützen, ist in vivo auf Porphyrinderivate gerichtet (BURNETT, 1976). Insbesondere die Chlorophylle der Photosyntheseorganismen sind in der Lage, wenn sie absorbierte Lichtenergie nicht in anderer Weise abgeben können, diese auf das Sauerstoffmolekül zu übertragen. Der entstehende singulett-angeregte Sauerstoff kann den Organismus letal schädigen. Aus diesem Grunde muß sich die Fähigkeit von Organismen, Carotinoide zu synthetisieren, schon in einem frühen Stadium der Evolution herausgebildet haben. Spätestens die photoautotrophen Organismen, welche aufgefangene Lichtenergie zur Synthese energiereicher Kohlenhydrate nutzen können, mußten die Fähigkeit zur Carotinoidsynthese entwickelt haben. In ihnen liegen Bedingungen vor, unter denen eine

photooxidative Schädigung mit Sicherheit herbeigeführt wurde:

1. Der Photosyntheseprozess läuft nur im Licht ab.
2. Die Chlorophylle, welche die Lichtreaktionen in der Reaktionskette der Photosynthese katalysieren, sind Porphyrinderivate und damit effektive Sensibilisatoren des Photooxidationsprozesses.
3. Bei der in der Photosynthese photoautotropher Organismen stattfindenden Wasserspaltung wird Sauerstoff direkt am Orte der Lichtreaktion freigesetzt.

Es ist daher wahrscheinlich, daß in dieser Phase der Evolution eine enge Kopplung zwischen der Entwicklung der strukturellen Grundlagen des Photosyntheseapparates, der Carotinoidsynthese und der räumlichen Anordnung der Carotinoide im Bereich der photosynthetischen Strukturen eingetreten ist.

Verschiedene Untersuchungen, in denen eine räumliche Isolierung der strukturellen Untereinheiten des Photosyntheseapparates durch Herstellung von PS II und PS I-Subchloroplasten-Partikeln versucht wird, unterstützen diese Annahme. Carotinoide werden u.a. als "essentielle Bestandteile" dieser Subchloroplastenpartikel bezeichnet. Sie können in unterschiedlichem Mengenverhältnis Carotine/Xanthophylle in den Photosystemen vorliegen. So erhielten WESSELS et al. (1973) an einer Partikelpräparation von Spinatchloroplasten drei Fraktionen: F_I , eine Fraktion mit hoher PS I-Aktivität, F_{II} , von der die Autoren annahmen, es handle sich um den Reaktionszentrumskomplex von PS II und F_{III} , welche möglicherweise den "akzessorischen Pigmentkomplex" von PS II enthält. Diese Partikelfraktionen sind durch folgende Pigmentgehalte charakterisiert: F_{II} hat ein hohes Chl a/b-Verhältnis, in diesen PS II repräsentierenden Partikeln ist β -Carotin angereichert und ein essen-

tieller Bestandteil (OKAYAMA, BUTLER, 1972).

PS I enthält einen hohen Betrag an Chl a und außerdem reichlich P_{700} und β -Carotin. F_{III} ist charakterisiert durch ein niedriges Chl a/b-Verhältnis und hohen Gehalt an Xanthophyllen.

GRIMME (1974) untersuchte die Carotinoidzusammensetzung von PS I und PS II-Partikeln, die er aus Subchloroplastenpräparationen von Chlorella isoliert hatte. Die PS II-Partikel enthaltenden DT 30-Chloroplastenfragmente zeigen ein Verhältnis von β -Carotin : Xanthophyllen von 1:3,8, während die PS I-Partikelfraktion DT-144) ein Verhältnis β -Carotin/Xanthophylle von 1:1,8 aufweisen.

Innerhalb der Xanthophylle zeigte sich in PS I eine Anreicherung von Violaxanthin und eine Anreicherung von Lutein in PS II.

Eine weitere Untergliederung von PS II und PS I-Partikeln in kleinere Bausteine, Chlorophyll-Protein-Komplexe, erbrachte zusätzliche Informationen über die Assoziation von Carotinoiden mit Photosynthesereaktionszentren und -Strukturen. So enthält der P_{700} -Chlorophyll a-Protein-Komplex THORNBERS als wesentliche Pigmente Chlorophyll a und β -Carotin. Das Verhältnis der Pigmente beträgt 20-30:1 (Chl a: β -Carotin). Interessant ist dabei, daß der Komplex kein Chlorophyll b enthält (THORNBUR, 1975).

Der aus einer PS II-angereicherten Subchloroplastenfraktion erhaltene "Complex II" (ANDERSEN, 1975), den THORNBUR als "Light harvesting chlorophyll a/b-protein" bezeichnet, enthält äquimolare Mengen an Chlorophyll a und b. Außerdem kann jedes im Chloroplasten vorhandene Carotinoid in diesem Komplex nachgewiesen werden, jedoch nicht unbedingt im gleichen Mengenverhältnis. Hauptcarotinoide in diesem Komplex sind Lutein und β -Carotin, jedoch auch Neoxanthin liegt in größerer Menge vor. Die molaren Verhältnisse von Chlorophyllen zu Carotinoiden variieren zwischen 3-7:1. Für den kürzlich isolierten "light harvesting chlorophyll a/b protein

complex" von Chlamydomonas reinhardtii fanden KAN und THORNER (1976) ein Chlorophyll/Carotinoid-Verhältnis von 6:1. Die Carotinoide setzen sich dabei wie folgt zusammen: Neoxanthin 13-22%, Violaxanthin 27-35%, Lutein 31-39%, β -Carotin 8-23%.

Als Funktion für den "Complex II" nimmt THORNER an, daß in ihm von Chlorophyll b absorbierte Energie auf Chlorophyll a übertragen wird und daß dieser Transfer hauptsächlich innerhalb des "light harvesting chlorophyll a/b-protein" stattfindet. Da von Chlorophyll b absorbierte Energie hauptsächlich im Photosystem II aktiv ist, fungiert der Komplex als Haupt-Antennenkomplex in diesem Photosystem.

Als weitere Funktion des Komplexes wird eine Beteiligung an der Granabildung in den Chloroplasten angesehen. Gestützt wird diese Annahme dadurch, daß Photosynthesemembranen, die wenig oder gar keine Anzeichen des "stacking" zeigen (z.B. Bündelscheidenchloroplasten; etiolierte Bohnenblätter, welche Lichtblitzen ausgesetzt waren; einige Algenmutanten und Mutanten von Höheren Pflanzen), wenig oder gar kein "light harvesting chlorophyll a/b protein" enthalten. Andererseits wird der "Complex II" ebenfalls nicht in einer Chlorophyll b-losen Gerste-Mutante, die jedoch einige Grana in den Chloroplasten enthält, gefunden. Als mögliche Beziehung zwischen Complex II und Photosynthesemembranen wird die prinzipielle Lokalisierung des Pigment-Protein-Komplexes in den Grana-Thylakoiden angesehen. Über die Carotinoide innerhalb dieses Pigment-Protein-Komplexes schreibt THORNER (1975): "There are no data available on the function of the carotenoids in this chlorophyll-protein, but interestingly, these pigments occur in a characteristic, stoichiometric ratio."

Damit wird die Frage aufgeworfen, ob die Carotinoide generell als akzessorische Pigmente wirken können,

oder ob diese Funktion auf einige bestimmte Carotinoide in möglicherweise einigen speziellen Organismen beschränkt ist. Schließlich wird der "light harvesting chlorophyll a/b protein complex" als eine universelle Struktureinheit in Photosyntheseorganismen dargestellt, der die spektrale Empfindlichkeit und damit die Effektivität speziell von PS II steigern soll.

1.2.6. Problemstellung und Ziel

Die vorgestellten Untersuchungen und Ergebnisse zeigen, daß eine enge Assoziation zwischen Carotinoiden und photosynthetischen Reaktionszentren bzw. deren Untereinheiten besteht.

Untersuchungen zur Entwicklung von Photosynthese-Aktivität, Chloroplastenstrukturen und Pigmentsynthese geben Hinweise, daß außerdem noch eine enge regulatorische Beziehung zwischen Pigmentsynthese und der Entwicklung der Photosynthesestrukturen existiert. Hier soll insbesondere der Einfluß der Carotinoide auf derartige Entwicklungsphänomene berücksichtigt werden.

STERN et al. (1964) fanden in Euglena eine deutliche Parallelität zwischen der Kinetik der Pigmentbildung, der photosynthetischen O_2 -Entwicklung und CO_2 -Fixierung und der Membranbildung.

Eine große Zahl Mutanten von Algen und Höheren Pflanzen mit abnormer Carotinoidsynthese zeigen **abnorm** strukturierte Chloroplasten. Zwei Helianthus-Mutanten ("Albina" und "Xantha"), welche kein β -Carotin synthetisieren konnten, wurden von WALLIS (1965) auf ihre Chloroplastenentwicklung untersucht. Bei Anzucht in Dunkelheit zeigen die Chloroplasten beider Mutanten normale Prolamellar-Körper. Belichtung mit normaler Lichtintensität führt in beiden Mutanten zu einer Zerstörung der Plastiden. Die Plastiden verlieren ihre regelmäßige Form und gehen in eine un-

regelmäßige amöboide Form über.

Bei Belichtung mit Schwachlicht entwickeln sich in der "Albina"-Mutante, die weder über gefärbte Carotine (β -Carotin) noch über Xanthophylle verfügt, aus dem Prolamellarkörper wenige Vesikel und Scheiben, die in Form primärer Thylakoide angeordnet sind.

In den Chloroplasten der "Xantha"-Mutante entwickelten sich unter schwachem Licht Vesikel und Scheiben sowie wenige große Grana.

Außerdem bleichten die Chloroplasten dieser Mutante nicht so schnell aus, wie die der "Albina"-Mutante. WALLIS folgert daraus, daß zwar die für etioliierte Chloroplasten typische Umstrukturierung des Prolamellarkörpers in Membranen in Abwesenheit von β -Carotin bzw. bei der Albina-Mutante auch bei Abwesenheit der Xanthophylle stattfinden kann, jedoch eine weitere Synthese und Ausbildung eines normalen Thylakoidsystems auf β -Carotin angewiesen ist. Ähnliche Ergebnisse findet BACHMANN et al. (1967) an Mais-Mutanten, deren Carotinoidsynthese gestört ist. An der Chlorella-Mutante 5/520, in der die Carotinoidsynthese auf der Stufe des Lycopins blockiert ist, fand CLAES (1966), daß bei Belichtung unter anaeroben Bedingungen, unter denen zwar die Zyklisierung der Carotinoid-Vorstufen in α - und β -Carotin abläuft, jedoch keine Xanthophyllsynthese stattfinden kann, auch keine Thylakoid-Membranen gebildet wurden.

Auch die Scenedesmus-Mutante PG₆ (POWLS, 1971), in der die Carotinoidsynthese blockiert ist, entwickelt eine abnorme Chloroplastenstruktur. Der Carotinoid-Gehalt in der photosensitiven Mutante liegt in der Größenordnung des Wildtyp-Carotinoidgehaltes, jedoch liegen in PG₆ nur die stark ungesättigten Carotine Phytoen, Phytofluon und ξ -Carotin vor. Als Chlorophyll liegt Chlorophyll a in ca. 1/6 der Wildtyp-Menge vor.

BECKER und LICHTENTHALER (1974) kommen bei Untersuchungen über die Steuerung der Carotinoid-Synthese durch Rotlicht zu der Auffassung, daß aktives Phytochrom in ergrünenden Raphanus-Keimlingen die Carotinoidsynthese kontrolliert, welche mit der Thylakoidbildung verknüpft ist.

Über die grundsätzlichen Funktionen der Carotinoide in Photosyntheseorganismen herrscht heute insofern Klarheit, als die von ihnen ausgeübte Schutzwirkung und ihre Aktion als akzessorische Pigmente unzweifelhaft belegt sind. Jedoch gibt es bezüglich der Aussage, daß die Schutzwirkung bei Carotinoiden mit 9-11 konjugierten Doppelbindungen im Molekül optimal sei, Widersprüche.

So war beispielsweise eine Korn-Mutante, mit welcher LANG et al. arbeiteten (s. KRINSKY, 1971, S. 677), photosensitiv, obwohl in ihr Lycopin, ein Carotinoid mit 11 konjugierten Doppelbindungen, akkumuliert war. Auch die von CLAES (1954) isolierte Chlorella-Mutante 5/520 wird photooxidativ zerstört, wenn sie unter normalen Lichtverhältnissen zum Ergrünen gebracht werden soll. Photooxidativer Chlorophyllabbau tritt ein, obwohl neben Phytoen, Phytofluen und ξ -Carotin Proneurosporin und Prolycopin, polycis-Isomere von Neurosporin mit 9- und Lycopin mit 11 konjugierten Doppelbindungen vorliegen. Ergrünungsexperimente können daher an der Mutante nur unter Schwachlicht (500) Lux (DUBERTRET und JOLIOT, 1974). durchgeführt werden.

Die Frage, welche Carotinoide absorbierte Lichtenergie auf Chlorophylle übertragen können, bedarf auch noch einer weitergehenden Klärung. So wird zwar allgemein angenommen, daß sowohl Xanthophylle, als auch Carotine allgemein imstande sind, als akzessorische Pigmente zu wirken. Ein Beweis, daß dies tatsächlich so ist, steht jedoch noch aus. Unzweifelhafte Belege über die Funktion spezieller Carotinoide als akzessorische Pigmente gibt es m.E. für Fucoxanthin, das Hauptcarotinoid der Braunalgen

(s. speziell DUTTON et al., 1943) und die im folgenden beschriebenen Carotinoide Peridinin und β -Carotin. In einem aus Dinoflagellaten isolierten Peridinin-Chlorophyll a-Protein konnte ebenfalls Energietransfer eines Carotinoids - hier Peridinin - nachgewiesen werden (s. THORNER, 1975).

Die Untersuchungen von GOEDHEER (1965) an Tribonema equale, einer Chlorophyll b-freien Grünalge, belegen, daß β -Carotin seine Anregungsenergie direkt auf Chlorophyll a übertragen kann. An anderen Organismen gewonnene Ergebnisse deuten demgegenüber darauf hin, daß ein Transfer nur über Chl. b auf Chl. a erfolgen kann (KOREN und EPEL, 1976, "Rom") (s. 1.4.2.).

Voruntersuchungen an der Mutante C-6D von Scenedesmus obliquus hatten gezeigt, daß diese Mutante in Dunkelheit azyklische Carotine (bis zur Stufe des Lycopins) akkumuliert und außerdem - bei Anzucht unter vollständigem Lichtausschluß - keine Photosynthesekapazität zeigt. Bei Belichtung findet eine Ergrünung der Mutante gekoppelt mit Zunehmen der Fähigkeit, Photosynthese zu betreiben, statt.

Die Mutante schien daher geeignet zu sein, die mögliche Verknüpfung zwischen Entwicklung des Photosyntheseapparates und Carotinoidsynthese zu untersuchen. Außerdem sollte versucht werden, festzustellen, ob die akkumulierten azyklischen Carotinoide das vorkommende Chlorophyll vor Photooxidation schützen können, oder ob dies an das Auftreten zyklischer Carotinoide geknüpft ist. Das heißt: Können die zyklischen Carotinoide in vivo besseren Schutz gewährleisten als die azyklischen?

Weiterhin war die Frage zu klären, ob, und wenn möglich, welche Carotinoide als akzessorische Pigmente wirken können, und ob möglicherweise der Energietransfer auf Chlorophyll b angewiesen ist.

2. Methodik

2.1. Objekt und Anzucht

Die Untersuchungen wurden an der röntgenstrahl-induzierten Mutante C-6D der einzelligen Grünalge Scenedesmus obliquus durchgeführt. Diese Mutante synthetisiert bei heterotropher Dunkelanzucht nur Carotinoid-Vorstufen und Chlorophyll a.

Eine Beschreibung der Erzeugung der Mutante ist bei BISHOP (1971) zu finden.

Die Algen wurden unter sterilen Bedingungen in einer auf heterotrophes Wachstum der Algen abgestimmten Nährlösung kultiviert.

Als Basis diente eine Nährlösung nach KESSLER et al. (1957), verändert nach BISHOP und SENGER (1971), versetzt mit 1 ml/l der Spurenelementlösung A₅ nach KRATZ und MYERS (1955). Die Anzucht in Dunkelheit erfolgte in 500 ml Erlenmeyer-Kolben, welche 250 ml Nährmedium enthielten, in einem Dunkel-Inkubator (Typ G 25 New Brunswick Scientific Co. Inc.) bei 30°C. Um zu gewährleisten, daß sich die Algen unter völligem Lichtabschluß entwickelten, wurden die Erlenmeyer-Kolben mit schwarzem, lichtundurchlässigen Stoff umkleidet.

Für alle Experimente wurden Algen verwendet, die mindestens zweimal in frisches Nährmedium (250 ml) transferiert worden waren (transferierte Menge 25-30 ml Algensuspension), wobei der Transfer bzw. das Belichten oder Ernten der Algen (je nach Experiment) jeweils nach 3 Tagen Dunkelwachstum erfolgte. Nach dieser Zeit wird von der Kultur das Ende der logarithmischen Wachstumsphase erreicht. Die beschriebene Prozedur gewährleistet, daß möglichst reproduzierbar identisches Material für die Experimente verwendet wird.

Zur Ergrünung wurden die Algen im heterotrophen Nährmedium verbleibend in Kulturröhren von 42 cm

Länge und 3,7 cm Durchmesser gegeben, in einen Lichtthermostaten gestellt (KUHLE und LORENZEN, 1964), mit weißem Mischlicht von 15 000 Lux (an der Oberfläche der Kulturröhren) bestrahlt und bei 30°C mit einem Gasgemisch von 3% CO₂ in Luft durchperlt. Die Belichtung erfolgte mit einer Kombination von neun Leuchtstoffröhren, wobei die Röhrentypen Osram L 40W/15-1 (Tageslicht) und Osram L 40W/25-1 (Universal weiß) verwendet wurden. Weitere Einzelheiten werden bei SENGEL et al. (1972) beschrieben.

Von den belichteten Algen wurden in bestimmten Zeitabständen Proben genommen und untersucht.

2.2. Bestimmung von Wachstumsparametern und Bezugsgrößen

Zur Bestimmung der Zellzahlen wurde außer einer Zählkammer (Thoma neu) ein Coulter-Counter (Coulter Electronics, Ltd., Engl., Counter Modell Z_BI, Channelizer, xy Recorder) eingesetzt.

Die Öffnung der Zählkapillare betrug 50 µm Ø, als Medium diente Isoton, in welches jeweils eine bestimmte Menge Algensuspension gegeben wurde, anschließend wurde 6 x ein Vol. von 0,05 ml ausgezählt und der Mittelwert errechnet.

Die PCV-Bestimmung (packed cell volume) erfolgte durch 5-minütiges Zentrifugieren der in Hämatrieröhrchen (nach Hamburger) befindlichen Algensuspension in einer Tischzentrifuge (Labofuge II, Heraeus Christ, Osterode) bei Höchstgeschwindigkeit (1400 x g).

Die Chlorophyllbestimmung erfolgte nach mehrmaliger Extraktion der Algenzellen, denen zur Vermeidung von Phaeophytinbildung Magnesiumhydroxidcarbonat zugesetzt wurde, mit siedendem Methanol und Messung der Extinktion des Methanolextraktes bei 665

und 650 nm in einem Einstrahlspektralphotometer PM Q III (Zeiss). Die Umrechnung wurde mit den von HOLDEN (1965) nach den spezifischen Extinktionskoeffizienten von MacKINNEY (1941) errechneten Formeln vorgenommen.

2.3. Isolierung, Identifizierung und quantitative Bestimmung der Pigmente

2.3.1. Isolierung der Pigmente

Die untersuchten Pigmente sind licht-, sauerstoff- und temperaturempfindlich. Aus diesem Grund wurden folgende Sicherheitsvorkehrungen getroffen: Die gesamte Extraktion und Aufarbeitung der Pigmente erfolgte in einem Dunkelraum unter grünem oder gelbem Sicherheitslicht, um lichtbedingte Isomerisierungen der Carotinoide zu verhindern. Weiterhin wurde soweit wie möglich unter Sauerstoffausschluß gearbeitet (N_2 -Begasung), um eine Oxydation der Pigmente zu vermeiden.

Die Raumtemperatur wurde stets unter $20^{\circ}C$, die Temperatur eines beim Eindampfen der Proben im Rotationsverdampfer (Rotavapor-B, Büchi, Schweiz) bis zur Trockenheit verwendeten Wasserbades $\leq 30^{\circ}C$ gehalten.

Proben, die nicht direkt aufgearbeitet werden konnten, wurden mit N_2 begast und anschließend luftdicht verschlossen und unter Lichtabschluß bei $-20^{\circ}C$ aufbewahrt.

Zur Untersuchung der Pigmente wurde eine definierte PCV-Menge geerntet, mit Methanol extrahiert und der methanolische Rohextrakt im Rotationsverdampfer unter Vakuum vollständig eingedampft. Anschließend wurden die Pigmente in Aceton aufgenommen und als Aceton-Extrakt strichförmig mit einer Pipette auf kurz vorher getrocknete Dünnschichtplatten aufge-

tragen. Die Auftrennung der Pigmente erfolgte ausschließlich mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie.

Eine Vortrennung der Pigmente in Gruppen ähnlicher Polarität wurde mit dem Verteilungschromatographiesystem A nach HAGER und MEYER-BERTENRATH (1966) modifiziert nach METZNER, RAU und SENGER (1965) durchgeführt.

Schichtzusammensetzung für 5 Platten 20x20 cm:

20 g Kieselgel Merck Nr. 7731

12 mg Ca(OH)_2

44 ml 5×10^{-3} M wäßrige Ascorbinsäurelösung

Laufmittel:

100 ml Petroleumbenzin Siedebereich 40-60°C

10 ml Isopropanol

0,25 ml H_2O

Die in diesem System erhaltenen Banden wurden ausgekratzt und sofort in verschiedene Lösungsmittel (nach HAGER und MEYER-BERTENRATH, 1966) überführt.

Das Auswaschen der Pigmente erfolgte sukzessiv durch Aufschütteln und Waschen mit anschließendem Abzentrifugieren des Schichtmaterials und Dekantieren des gefärbten Überstandes in bereitstehende Sammelbehälter.

Fast alle im Verteilungschromatographischen System erhaltenen Banden waren Mischungen von mindestens zwei Pigmenten. Eine weitere Auftrennung dieser Banden

erfolgte mit dem Adsorptionschromatographie-System B, Laufmittel 1 und 2 b nach HAGER und MEYER-BERTENRATH (1966). Speziell die Trennung von Phytoen, Phytofluon, α - und β -Carotin erfolgte auf der Schicht B mit einem Laufmittelgemisch von Isooctan/Isopropanol im Verhältnis 100/1 nach WILLIAMS (1971).

2.3.2. Identifizierung der Pigmente

Die Identifizierung der Carotinoide basiert auf folgenden Untersuchungen:

1. Verhalten im Verteilungschromatogramm:

Da hier eine Aufspaltung der Pigmente in Gruppen ähnlicher Polarität erfolgt, können aus der Lage der Banden im Verteilungschromatogramm Informationen bezüglich der möglichen Zahl sauerstoffhaltiger Gruppen im Molekül erhalten werden.

2. Form des Absorptionsspektrums und Lage der Maxima bei Lösung der Pigmente in verschiedenen Lösungsmitteln:

Aus der Form des Absorptionsspektrums und der Lage der Maxima können Rückschlüsse auf die Chromophore des Carotinoid-Moleküls gezogen werden. Als Vergleichsdaten dienten Absorptionsmaxima aus DAVIES (1976) und Spektren und Absorptionsmaxima aus HAGER und MEYER-BERTENRATH (1967 a und b).

3. Die cis-trans-Isomeren wurden mit Hilfe der Jodkatalysierten cis-trans-Isomerisation und der sich dabei verändernden Form und Lage des Absorptionsspektrums identifiziert.

Vergleichsdaten wurden verwendet aus:

MAGOON, ZECHMEISTER (1957); ZECHMEISTER, KENNETH KOE (1954); ZECHMEISTER, LeROSEN, SCHROEDER (1943); ZECHMEISTER, PINCKARD (1947).

4. Bestimmung von Zahl und Lage der OH-Gruppen:
Die Zahl der OH-Gruppen wurde durch Acetylierung festgestellt, während mittels Ätherbildung und Eliminierung die Zahl der allylständigen OH-Gruppen ermittelt wurde.
5. Die Bestimmung der Zahl der 5,6-Epoxidgruppen erfolgte durch säurekatalysierte Umlagerung der 5,6-Epoxide in ihre furanoiden Formen, die 5,8-Epoxide.
Sowohl die Bestimmung der OH-Gruppen als auch die Zahl der Epoxid-Funktionen erfolgte nach HAGER und STRANSKY (1970 I).
6. Die ungefärbten Carotine Phytoen und Phytofluene wurden aufgrund ihrer Fluoreszenz im Chromatogramm und ihrer Absorptionsspektren identifiziert. Die Absorptionsspektren der Pigmente wurden mit einem Aminco DW2 und einem Shimadzu MPS-50L oder Shimadzu MPS 5000 Spektralphotometer aufgenommen.

2.3.3. Quantitative Bestimmung der Pigmente

Die quantitative Bestimmung der isolierten Pigmente erfolgte nach der von HAGER und MEYER-BERTENRATH (1966) angegebenen Formel unter Verwendung von $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ - Werten aus DAVIES (1976), HAGER und MEYER-BERTENRATH (1966) und JEFFREY (1968). Für die cis-Isomeren wurde ein Umrechnungsfaktor bestimmt, der die Verhältnisse der Absorptionsmaxima der cis-Formen zum Absorptionsmaximum des zugehörigen Gleichgewichtsgemisches nach J_2 -Katalyse und das Verhältnis des Maximums des Gleichgewichtsgemisches zum Maximum der all-trans-Form berücksichtigt.

2.4 Photosynthetische Sauerstoffmessungen

Sauerstoffentwicklung durch Photosynthese und bei der Hill-Reaktion mit p-Benzochinon als Hill-Reagenz

wurden polarographisch mit einer Micro-Clark-Elektrode in einem Gilson-Oxygraph (Gilson Medical Electronics, Middleton, Wisconsin/Techmation, Düsseldorf) bei einer Polarisationsspannung von -0,8V gemessen.

Die Clark-Elektrode hängt in ihrer Empfindlichkeit im Bereich zwischen 20 und 35°C linear von der Temperatur ab. Aus diesem Grunde konnten alle Messungen bei gleicher Temperatur (28°C im Optimum der Photosynthese (SENGER, 1968) durchgeführt werden. Eine Eichung der Elektrode zur quantitativen Sauerstoffbestimmung wurde gegen luftgesättigtes Wasser (100%-Wert) vorgenommen; als Null-Wert diente der Zero-Current.

Bestimmt wurde jeweils der O_2 -Umsatz von Algensuspensionen, die auf 10 µl PCV/ml eingestellt waren. Die Hill-Reaktion mit p-Benzochinon wurde ebenfalls mit derselben Versuchsanordnung gemessen; die p-Benzochinon-Endkonzentration der Suspension war $3 \times 10^{-3} M$.

Die Algensuspension wurde zur Messung in eine temperierbare Reaktionskammer aus Glas gegeben, in welche die Micro-Clark-Elektrode hineinragte. Eine Sedimentation der Algen während der Messung wurde durch einen Magnetrührer verhindert. Als Lichtquelle diente ein Projektor (Prado Universal Leitz, Lampe 24 V 250 W), in dessen Strahlengang sich ein rotes Plexiglasfilter (durchlässig oberhalb 620 nm) befand.

Die Lichtintensität von $7,9 \times 10^{-5} \text{ erg} \times \text{cm}^{-2} \times \text{sec}^{-1}$ war so gewählt, daß - mit Ausnahme bei frühen Ergrünungsstadien - sättigende Lichtbedingungen vorlagen.

Der in Dunkelheit gemessene O_2 -Verbrauch wurde als Atmung der bei Belichtung erfolgenden O_2 -Entwicklung hinzugefügt.

2.5. Messung des Quantenbedarfs

Der Quantenbedarf der Photosynthese bei der Ergrünung der C-6D-Kulturen wurde im Anschluß an die Bestimmung der absoluten Absorption der vorbereiteten Algenproben mit Hilfe einer "Ulbricht-Kugel" gemessen. Nach Messung der Absorption wurde die jeweilige Probe mit einem Strahl von monochromatischem Licht (679 nm) bestrahlt, deren Intensität mit dem Chlorophyll-Thioharnstoff-Actinometer nach SENGHER (1972) bestimmt wurde. Die photosynthetische Sauerstoffentwicklung wurde nach der Warburg-Methode in einem "All-Glas-Differential-Manometer" (Gilson Medical Electronics), welches sich in einem speziell zur Messung der Quantenausbeute entwickelten Apparat befand, gemessen (s. SENGHER, 1972).

2.6. Herstellung zellfreier Systeme

Zur Herstellung photosynthetisch aktiver Partikel wurde eine von BERZBORN und BISHOP (1973) vorgestellte und nach MELL (1974) und MELL und SENGHER (1976) optimierte Methode gewählt.

Eine definierte Algenmenge wird durch Zentrifugation geerntet, 1 x mit Pufferlösung (=Aufbruchmedium) gewaschen und anschließend in soviel Aufbruchlösung suspendiert, daß eine Konzentration von 1ml PCV/20 ml Aufbruchlösung entstand.

Diese Suspension ist für den Aufbruch der Zellen mit gewaschenen Glasperlen (0,7 mm Ø) so gemischt und so in einen Stahlbecher gefüllt worden, daß die Mischung bis 2 mm unter dem Rand des Stahlbechers steht und die Glasperlen mit dem Flüssigkeitsspiegel gleich hoch abschließen.

Je nach benötigter Menge wurden Stahlbecher mit 18,5 ml, 52 ml oder 108 ml Fassungsvermögen

verwendet.

Die Vibrogen-Zellmühle befand sich in einem Kälte-labor (+ 4°C), und der Stahlbecher mit dem Glas-perlen/Algensuspension-Gemisch wurde mit Eiswasser im Durchfluß 5 min vorgekühlt.

Die Aufbruchdauer betrug immer 5 Minuten. Selbst bei einer Homogenisationsdauer von 10 Minuten steigen die Temperaturen in der Glasperlen/Algen-suspension nicht überdurchschnittlich 1,5°C, maximal 2,9°C an. Nach dem Mahlvorgang wurde das Homogenat über eine Fritte (Schott & Gen., Typ 17 D 1) von den Glasperlen abgetrennt. Mit dem Volumen der eingesetzten Algensuspension wurden die Glasperlen in zwei Schritten ausgewaschen.

Das gefilterte Homogenat wurde durch Differential-zentrifugation (570 x g; 5 min) von den ganzen Zellen befreit und als Chloroplastenpartikel-homogenat in den Versuch eingesetzt.

Die Zusammensetzung der Aufbruchlösung

Die Zusammensetzung der Aufbruchlösung wie sie BERZ-BORN und BISHOP (1973) wählten, wurde nach SELMANN und BANNISTER (1971) sowie GARNIER und MAROC (1971) modifiziert:

10^{-2} M Na Cl

10^{-2} M K Cl

$2,5 \times 10^{-3}$ M Mg Cl₂

10^{-5} M EDTA

2×10^{-2} M Tricine/KOH-Puffer.

Der Tricine-Puffer wurde jedoch durch einen Phosphat-Puffer nach Sörensen 0,05 M pH 7,5 ersetzt.

2.7. Messung von Photosystem II-Aktivität

Photosystem II-Aktivitäten wurden an intakten Zellen als Hill-Reaktion mit p-Benzochinon gemessen (s. dazu 2.4.).

An Partikeln wurden Photosystem II-Reaktionen als DCPIP-Hill-Reaktion in einem Spektralphotometer (Aminco DW 2) im Split-Beam-Verfahren gemessen. In Proben- und Referenzküvette wurden gleiche Mengen an Partikelsuspensionen gefüllt, die Endkonzentration an DCPIP betrug jeweils 4×10^{-5} M.

Die Probenküvette wurde seitlich mit einem Projektor (Prado Universal, Leitz Wetzlar), in dessen Strahlengang sich ein Rotglasfilter mit einer Durchlässigkeit oberhalb 650 nm befand, belichtet. Die eingestrahlte Lichtintensität betrug $2,8 \times 10^5 \text{ erg} \times \text{cm}^{-2} \times \text{sec}^{-1}$. Die Extinktionsabnahme während der Belichtung wurde bei 579,5 nm kontinuierlich registriert. Der Photomultiplier wurde vor dem von den Partikeln gestreuten Anregungslicht durch Interferenzlinienfilter (IL 578 und DIL 581, Schott Mainz) geschützt.

Unter Verwendung der beschriebenen Filterkombination wurde bei pH 7,5 ein millimolarer Extinktionskoeffizient von $\epsilon = 6.125 \text{ cm}^2 / \text{mM}$ bestimmt.

Dieser Extinktionskoeffizient wurde bei der Bestimmung des quantitativen DCPIP-Umsatzes zugrunde gelegt.

Zur Messung der DCPIP-Reduktion an Digitonin-behandelten Partikeln wurde DPC als Elektronendonator für PS II eingesetzt. Bei der Behandlung von Chloroplastenpartikeln mit Detergentien wird das wasserspaltende System allgemein recht stark geschädigt. Um dennoch die Aktivität von PS II messen zu können, muß ein künstlicher Elektronendonator (DPC) eingesetzt werden.

Die Messung wird in folgenden Teilschritten voll-

zogen:

- a) An entsprechenden Partikelproben wird erst die DCPIP-Reduktion mit H_2O als Elektronendonator gemessen.
- b) Anschließend wird DPC aus äthanolischer Lösung bis zu einer Endkonzentration von 10^{-3} Mol zugegeben und die Reaktion erneut gemessen.
- c) Da im Falle b) auch PS I an der Reaktion beteiligt sein kann, wird nun die PS II-Reaktion mit 5×10^{-6} M DCMU gehemmt, die Reaktion erneut gemessen und Reaktion b) um den nicht hemmbaren Teil von Reaktion c), welche den PS I-Anteil wiedergibt, korrigiert.

2.8. Messung von Photosystem I-Aktivität

PS I-Aktivität wurde an Partikeln als Reduktion von Methylviologen gemessen. Das dabei entstehende Semichinon des MeV reagiert sofort mit Sauerstoff weiter, wobei das MeV regeneriert wird (IZAWA et al., 1966). Die dabei erfolgende O_2 -Aufnahme wird mit der unter 2.4 geschilderten Versuchsanordnung im Oxygraph gemessen. Die Zellen wurden nach 2.6. aufgeschlossen und der Partikelsuspension DCMU in der Endkonzentration von 5×10^{-6} M zugesetzt, um die Rest-PS II-Reaktion zu unterbinden (Beim Aufbruch der Zellen geht die Gesamt-Photosynthese-Aktivität weitgehend verloren, da die Elektronentransportkette durch Ablösung wasserlöslicher Redox-Systeme unterbrochen wird). Anschließend wird 5×10^{-3} M Ascorbat, 10^{-4} M DCPIP als Donatorsystem für PS I und 2×10^{-4} M MeV zugesetzt und die O_2 -Aufnahme unter Lichtsättigung gemessen.

Bei allen Reaktions- und Aktivitätsmessungen wurden parallel die Pigmente der Proben nach 2.2. bestimmt, um die Reaktion pro Chlorophyll jeweils

ermitteln zu können.

2.9. Herstellung und Trennung von Chloroplasten-Subpartikeln im Saccharose-Dichtegradienten

Nach Vorversuchen erwies sich die von MELL (1977) verwendete Methode der Trennung von Digitonin-behandelten Chloroplastenpartikelsuspensionen im kontinuierlichen Saccharose-Dichtegradienten als ein brauchbares System zur Verfolgung der strukturellen Entwicklung des untersuchten Organismus und der Veränderungen in der Aktivität der photosynthetischen Teilreaktionen.

Zur Herstellung von Subpartikeln wurde das nach 2.4. gewonnene Chloroplastenpartikelhomogenat mit einer 2%igen Digitoninlösung im Volumenverhältnis von 1:1 gemischt, so daß eine 1%ige Digitoninendkonzentration erreicht wurde. Das Digitonin ist für alle Subpartikelpräparationen unter Erwärmen im unter 2.6. beschriebenen Medium gelöst worden. Die digitoninhaltige Suspension wurde im Dunkeln bei 4°C eine Stunde mit einem Magnetrührer vorsichtig gerührt und dann auf einen Saccharose-Dichtegradienten gegeben.

Herstellung und Wahl der Dichtegradienten:

Das benötigte Endvolumen an Subpartikeln bestimmte die Wahl der Methode:

a) In der Regel wurden die Dichtegradienten in 2,54 cm x 8,98 cm Polycarbonat-Röhrchen aufgebaut:

Die kontinuierliche Abnahme der Saccharosekonzentration kam durch einen einfachen selbstgebauten Plexiglas-Gradientenmischer zustande. Die Zuckerlösung wurde über einen Glasrechen und eine Vielfach-Schlauchpumpe (Desaga, Heidelberg, Typ STA-V Vielfach Schlauchpumpe 13 1900) gleichmäßig und überschichtend auf 6 Zentrifugengläser verteilt. Auf die 30 ml-Gradienten ("kleine" Gradienten) wurde

je 7 ml Suspension gegeben.

b) Bei Bedarf von größeren Chloroplasten-Subpartikelmengen ist ein Zonalrotor der Firma Beckman, Typ J CF-Z (Beckman Instruments, Inc., Palo Alto, California) mit 1,9 l Fassungsvermögen verwendet worden. In diesem Fall betrug das Gradientenvolumen 1,6 l, und es wurden 150-200 ml Suspension eingesetzt und mit Aufbruchmedium bis zur Füllung des Rotors überschichtet (Zonal-Dichtegradient).

Die Zonal-Dichtegradienten sind mit einer speziellen Gradientenpumpe (Gradient Pump Model 141, Beckman Instruments, Inc., Palo Alto, California) aufgebaut worden, die auch zum Auspumpen des Gradienten in einen 2,5 l Standzylinder benutzt wurden.

Die "kleinen Gradienten" wurden mit einem Ausschwingrotor in einer Ultrazentrifuge (Rotor Type SW 27, Ultrazentrifuge Typ L 2-65 B, Beckman Instr., Inc., Palo Alto, California) bei 113 000 x g 14 Stunden zentrifugiert, die Zonaldichtegradienten in einer Kühlzentrifuge (Typ 21-B, Beckman Instr., Inc., Palo Alto, California) bei 35 000 xg (entspricht größtmöglicher Zentrifugalbeschleunigung des Systems) für 40 Stunden.

Die durch geringere Zentrifugalbeschleunigung notwendige Verlängerung des Laufes beim Zonaldichtegradienten hatte keinen Einfluß auf die Präparation.

Die Auftrennung der Subpartikel in beiden angewendeten Gradienten war identisch, und die Fraktionen wurden mit Hilfe einer Pipette mit angeschlossener Schlauchpumpe selektiv isoliert.

2.10. Spektroskopie von Algen und Partikeln

Zimmertemperatur-Absorptionsspektren wurden vergleichend in zwei Zweistrahlsspektralphotometern der Firma Shimadzu (Typ MPS 50 L bzw. MPS 5000) und

einem Gerät der Firma Aminco (DW2-UV-VIS) aufgenommen. Für die Messungen sind 3 ml und 1 ml Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 10 mm verwendet worden.

Die Tieftemperaturspektren wurden bei der Temperatur von flüssigem Stickstoff (77°K) in einem Zweistrahlsspektralphotometer (Shimadzu MPS 50 L) mit einer kommerziellen Tieftemperaturvorrichtung aufgenommen.

Alle Partikelproben waren im Aufbruchsmedium, die intakten Zellen im Nährmedium suspendiert.

Die entsprechenden Lösungen befanden sich in der Referenzküvette.

Die Küvettendicke betrug, abhängig von der Konzentration der Probe 1 mm oder 2 mm.

Ableitungsspektren ("Derivative Spectra") zur Erfassung von Chlorophyll b "in vivo" wurden mit den Spektralphotometern Aminco DW-2 und Shimadzu UV-300 aufgenommen. Dabei war das UV-300 wegen der elektronischen Erstellung von 0-Linie und Ableitung geeignet, sehr stark verdünnte Proben zu messen.

2.11. Fluoreszenzmessungen

Fluoreszenz-Anregungs- und Emissionsspektren bei Raum- und Tieftemperatur wurden mit dem Shimadzu Corrected Recording Spectrofluorometer RF 502 aufgenommen.

Eine Korrektur auf quantengleiches Licht bei Erstellung der Anregungsspektren erfolgte automatisch über die Messung der Fluoreszenz einer in das Gerät eingebauten Rhodamin B-Referenz.

Fluoreszenzinduktionskurven (Kautsky-Effekt) wurden mit dem Photomultiplier des Aminco DW2 bei manueller Arbeitsweise und einer Spannung von 500 V gemessen.

Die Probe wurde seitlich mit einem Blaulichtstrahl angeregt (Lichtquelle : Prado Universal, Leitz;

Filter: DAL 444 Schott Mainz) und im Winkel von 90° zum Anregungslicht die Fluoreszenz gemessen. Als Schutzfilter für den Aminco Photomultiplier wurde ein Interferenzfilter (IL 701, Schott Mainz) verwendet. Das Signal des Photomultipliers wurde direkt auf einen Speicheroszillographen gegeben (Tektronix 5A22N Differentialverstärker und Tektronix 5B 12N Oscilloscop) und von dort mit einer Polaroid-Kamera aufgenommen.

2.12. Hemmung der Carotinoid-Synthese

Als Hemmstoff wurde Nicotin-base (reinst, Serva Nr.30307) verwendet.

Von einer auf pH 7,3 gebrachten, sterilisierten Stammlösung wurden unter sterilen Bedingungen die entsprechenden Mengen in die Kulturgefäße bzw. Nährmedien gegeben und anschließend die Algen zugegeben. Die normalerweise eingestellte Nicotinkonzentration war 10^{-3} M.

Für Ergrünungsexperimente wurde die Kulturröhre nach Inkubation mit Nicotin noch 5 min in Dunkelheit gehalten und anschließend in den Lichtthermostaten gegeben (s. 2.1.).

Die Unterbindung der Xanthophyllsynthese wurde durch Begasen der Kultur mit Stickstoff "reinst" (welchem evtl. noch vorhandene O_2 -Spuren durch den Anschluß eines "Oxisorb" entzogen wurden) erreicht. Die Kultur wurde dabei wie unter 2.1. dargestellt, belichtet.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1. Charakterisierung der heterotrophen Dunkelkultur

3.1.1. Wachstumsparameter

Zur Charakterisierung des Ausgangsmaterials für die Ergrünungsexperimente seien an dieser Stelle kurz die Wachstumsparameter der heterotrophen Dunkelkultur vorgestellt.

Die Mutante C-6D wurde im Dunkeln in Flüssigmedium kultiviert und nach 3 Tagen jeweils in frisches Nährmedium überführt.

Nach dem Transfer von 25-30 ml Suspension von 3 Tage in Dunkelheit gewachsenen Algen trat folgende Entwicklung der Kultur ein (Abb. 4).

Das PCV der Kultur nimmt nach einer kurzen lag-Phase exponentiell zu und erreicht nach ca. $2\frac{1}{2}$ Tagen eine stationäre Phase, während der kein weiterer Zuwachs mehr erfolgt.

Die Teilungsaktivität der Algen ist direkt nach Überführung in frisches Nährmedium gering, nimmt dann exponentiell zu und sinkt vom 3. Tage an wieder ab; zwischen 3. und 4. Tag geht die Teilungsaktivität in die stationäre Phase über.

Da die Kurve der Teilungsaktivität insgesamt der Kurve der Zunahme der Algenmasse (PCV) nachläuft, kann dies die geringe Abnahme des PCV in der "stationären" Phase erklären. Entweder lassen sich die nach Beendigung des Volumenwachstums der Kultur noch durch Teilungen gebildeten kleinen Autosporen dichter zusammenzentrifugieren als die viel größeren Autosporen-Mutterzellen, oder es findet während der Teilungsaktivität ein Verbrauch von Zellmasse (unter anderem Stärke)

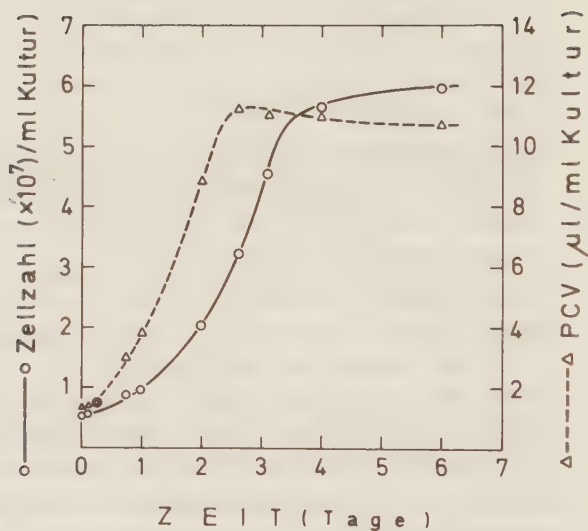


Abb. 4: PCV und Zellzahl (pro ml Suspension) der Scenedesmus-Mutante C-6D während des Dunkelwachstums bei 30°C.

(-----) PCV; (—) Zellzahl.

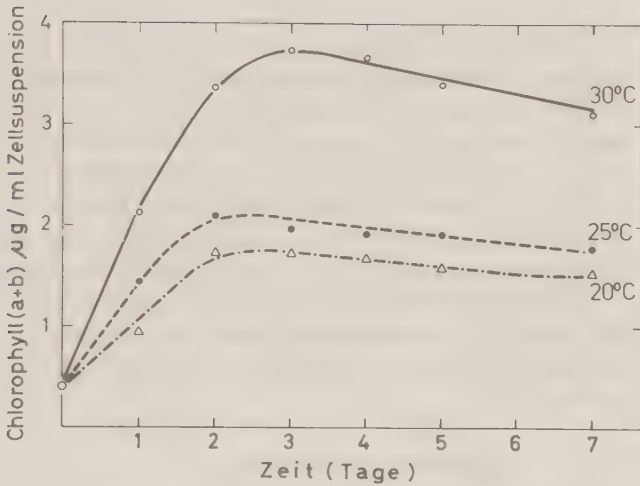


Abb. 5: Chlorophyllbildung während des Dunkelwachstums der Scenedesmus-Mutante C-6D bei verschiedenen Temperaturen. Die Anzucht erfolgte in einem Dunkelinkubator. Als Ausgangsmaterial dienten 25-30 ml einer drei Tage alten Dunkelkultur, welche in frisches Nährmedium transferiert worden waren.

statt, was zu einer effektiven Verkleinerung des Gesamtvolumens der Algen führt.

3.1.2. Chlorophyll während des Dunkelwachstums

Die Chlorophyllzunahme der Kultur bei Dunkelwachstum durchläuft (Kultivierung bei 30°C) ebenfalls am dritten Tag das Maximum (Abb. 5).

Die Darstellung der untersuchten Wachstumsparameter zeigt, daß die Kultur bei heterotropher Anzucht nach ca. 3 Tagen das Ende der logarithmischen Wachstumsphase erreicht. Kulturen, die diese Phase erreicht hatten, d.h. 3 Tage alte heterotrophe Dunkelkulturen dienten wegen ihrer Homogenität, die eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse gewährleistete, als Ausgangsmaterial für alle Experimente.

3.1.3. Pigmentzusammensetzung

Das Tieftemperaturabsorptionsspektrum ganzer Zellen zeigt, daß die Mutante C-6D bei Dunkelheit (im Vergleich zum Wildtyp) nur sehr wenig Chlorophyll bildet, und daß die in den Zellen vorhandenen Carotinoide wegen der unterhalb 450 nm stark ausgeprägten Absorptionsmaxima überwiegend eine oder mehrere Vorstufen der im Scenedesmus Wildtyp vorkommenden Carotinoide enthalten (Abb. 6).

Die dünnschichtchromatographische Trennung und weitere Analyse der Pigmente ergab, daß in der Mutante ausschließlich azyklische Carotinoidvorstufen akkumuliert sind und daß nur Chlorophyll a in den dunkel-kultivierten Algen vorliegt.

Bei der qualitativen Analyse der Pigmentzusammensetzung der Algenmutante C-6D wurden folgende Pigmente gefunden (s. Tabelle I).

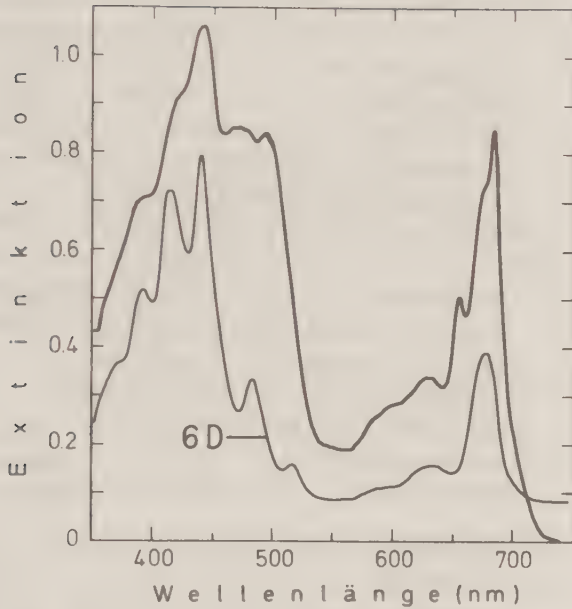


Abb. 6: Tieftemperatur-Absorptionsspektrum ganzer Zellen einer 3 Tage in Dunkelheit gewachsenen Kultur der Scenedesmus Mutante C-6D und des Wildtyps.

Die Spektren wurden in flüssigem Stickstoff in 1 mm Plexiglasküvetten in einem Shimadzu MPS-50L Spektralphotometer aufgenommen.

— : Wildtyp
- - : Mutante C-6D

Pigment	Dunkel- Kultur	Belichtete Kultur
Phytoen	+	(+)
Phytofluen	+	(+)
<u>S</u> -Carotin	+	+
Proneurosporin	+	-
cis-Neurosporin (416,438,467)	+	-
all-trans-Neurosporin (415,439 486,5)	+	+
Prolycopin	+	-
poly-cis-Lycopin "III" (444,468)	+	-
poly-cis-Lycopin (445,469)	+	-
cis-Lycopin (468,498)	+	-
all-trans-Lycopin	+	+
pro- γ -Carotin	Spuren	(+)
β -Zeacarotin	Spuren	(+)
α -Carotin	-	+
β -Carotin	-	+
Lutein	-	+
Zeaxanthin	-	+
Antheraxanthin	-	+
Violaxanthin	-	+
Loroxanthin	-	+
Neoxanthin	-	+
Chlorophyll a	+	+
Chlorophyll b	-	+

Tab. I: Pigmentzusammensetzung einer 3 Tage
im Dunkeln bei 30°C gewachsenen Kultur
und einer voll ergrüntten Kultur der
Scenedesmus Mutante C-6D
Zahlen in Klammern geben die Absorptions-
maxima der nicht näher charakterisierten
Isomeren an.
Lösungsmittel: Hexan

Die Alge weist in ihrer Pigmentzusammensetzung eine Ähnlichkeit mit der von Claes (1954) isolierten Chlorella-Mutante 5/520 auf, welche in Dunkelheit Phytoen, Phytofluen, β -Carotin, Protetrahydrolycopin (=Proneurosporin), Prolycopin und geringe Mengen an Chlorophyll bildet. Im Gegensatz zur Chlorella-Mutante 5/520 besitzt die Scenedesmus-Mutante C-6D jedoch außer Proneurosporin und Prolycopin eine Reihe weiterer cis-Formen dieser Pigmente und einen wesentlich höheren Betrag an Chlorophyll (a).

3.2. Verhalten der Kultur nach Überführung in Licht ("Ergrünung")

3.2.1. Wachstumsparameter

Bei Überführung der dunkelkultivierten Mutante C-6D in Licht tritt eine Veränderung der Färbung der Algen von gelblich-oliv-grün nach dunkelgrün ein.

Die parallel dazu auftretenden Veränderungen der Wachstumsparameter PCV und Zellzahl sind in Abb. 7 dargestellt.

Während der ersten drei Stunden nach Belichtungsbeginn tritt sowohl im PCV als auch in der Zellzahl keine Veränderung ein. Ein Einsetzen von Teilungsaktivität wird ab der 4. Stunde meßbar, während eine Zunahme des PCV erst von der 5. Stunde an feststellbar ist.

Über den gemessenen Zeitraum von 48 Stunden, über welchen sich die Ergrünungsexperimente allgemein erstreckten, nimmt das PCV linear zu, während die Teilungsaktivität nach ca. 24 Stunden Ergrünung langsam geringer wird, jedoch weiterhin anhält.

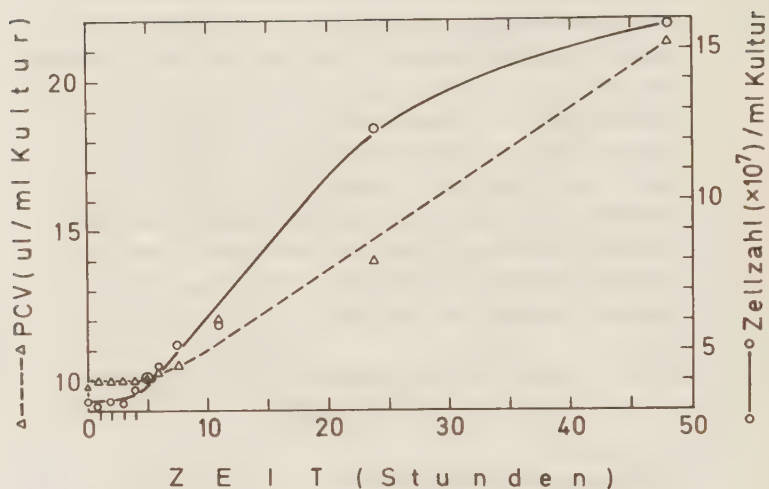


Abb. 7: PCV und Zellzahl während der Ergrünung der Scenedesmus Mutante C-6D. Die Kulturen wurden nach 3 Tagen Dunkelwachstum bei 30°C in weißes Mischlicht von 15 000 Lux überführt und mit 3% CO₂ in Luft begast. Die Temperatur während der Ergrünung betrug ebenfalls 30°C.

3.2.2. Pigmente während der Ergrünung

3.2.2.1. Chlorophylle

Die bei länger dauernder Belichtung sichtbare Veränderung der Farbe der Algen von gelb-oliv-grün nach dunkelgrün beruht auf charakteristischen Veränderungen der Pigmentzusammensetzung der Algen (s. Tab. I, S. 42). Dabei überdeckt die Zunahme des Chlorophylls die Veränderungen im Carotinoidgehalt. Die Resultate der dünn-schichtchromatographischen Trennung der Pigmentextrakte und die quantitative spektralphotometrische Bestimmung der getrennten Chlorophylle ergaben den in Abb. 8 a und b dargestellten Verlauf.

Während der ersten Stunde der Belichtung ist keine Veränderung im Chlorophyllgehalt meßbar. Meßbare Veränderungen im Chlorophyllgehalt der Algen treten zwischen der ersten und zweiten Belichtungsstunde ein und sind zur zweiten Stunde eindeutig erfaßbar. Dieser lag-Phase folgt eine Phase sehr intensiver Chlorophyll-Synthese, die ihr Maximum nach ca. 24 Stunden durchläuft, um anschließend in eine Phase geringerer Chlorophyllsynthese überzugehen.

Wie der Verlauf der Kurven in Abb. 8 a zeigt, nimmt das Chlorophyll pro ml Algensuspension weiterhin noch zu, wogegen das Chlorophyll bezogen auf das linear steigende PCV bereits ab der 24. Stunde der Ergrünung absinkt. Dieser Bezug von Pigment auf PCV wird im folgenden beibehalten, da die Reaktion ganzer Zellen ebenfalls auf PCV bzw. Chlorophyll einer vergleichbaren PCV-Menge bezogen werden.

Während der Ergrünung sinkt das Verhältnis Chlorophyll a/b von "unendlich" kommend bis zur 56. Stunde der Ergrünung auf einen Wert von 4,31 ab.

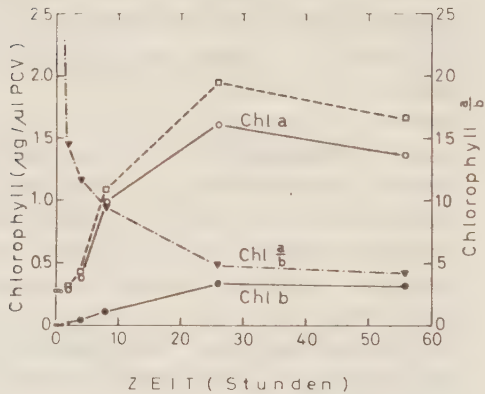
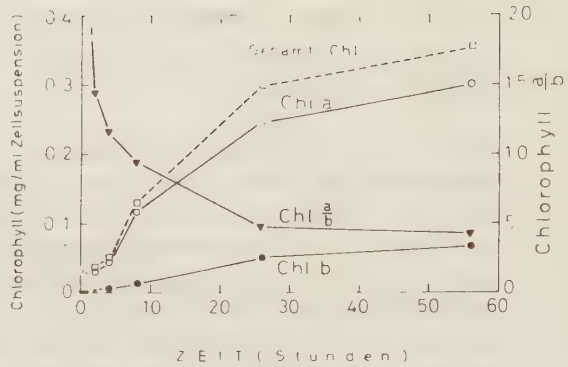


Abb. 8a und 8b: Chlorophyllbildung während der Ergrünung der Scenedesmus Mutante C-6D unter Weißlicht (15000 Lux) bei 30°C. Die Chlorophylle wurden im Dünnschicht-chromatographiesystem A nach Hager und Meyer-Bertenrath (1966) modifiziert nach Metzner, Rau, Senger (1965) getrennt und spektralphotometrisch bestimmt. In 8a wurden die Chlorophylle auf die Suspensionsmenge, in 8b auf die Menge des extrahierten PCV bezogen.

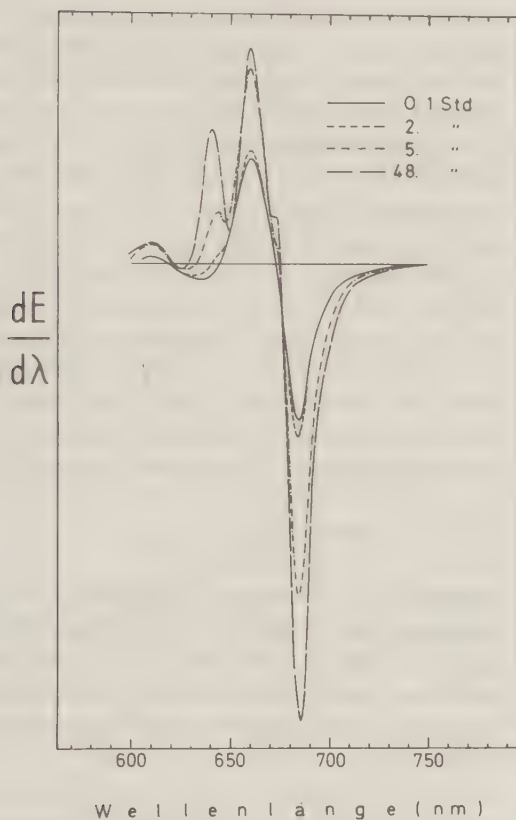


Abb. 9: In vivo Ableitungsspektren (1.Ableitung der Absorptionsspektren) einer ergrünenden Kultur der Scenedesmus Mutante C6D. Die 1.Ableitung wurde in einem Shimadzu UV 3000 Spektralphotometer direkt durch eine zusätzliche elektronische Verrechnungseinheit aus den Absorptionsspektren berechnet und mit einem gekoppelten Schreiber aufgezeichnet.

Das Einsetzen der Chlorophyllsynthese zwischen erster und zweiter Ergrünungsstunde bzw. das Fehlen einer Chlorophyllsynthese bis zum Ende der ersten Ergrünungsstunde wird auch durch "in vivo" Ableitungsspektren (Methodik s. De GREEF und BUTLER, 1971) von Zellsuspensionen während der Ergrünung gestützt (Abb. 9). Die Ableitungsspektren (erste Ableitung der Absorptionsspektren) von Dunkel-Kultur und einstündig belichteter Kultur zeigen keinen Unterschied, während zur zweiten Stunde der Ergrünung eindeutig eine Chlorophyll b-Synthese durch Ausbildung einer Schulter zwischen 640 und 650 nm feststellbar ist. Eine Zunahme des Chlorophyll a wird durch Vergrößerung des $\frac{dE}{d\lambda}$ -Wertes angezeigt.

4.2.2.2. Carotinoide

Während die Chlorophyllsynthese zu Beginn der Ergrünung der Algen eine lag-Phase durchläuft, setzt die Umwandlung der azyklischen Carotine in Folge- und Endstufen des Carotinoid-Biosyntheseweges sofort mit der Belichtung ein (Abb. 10).

Wie aus Abbildung 10 hervorgeht, nehmen die Gesamt-Carotine zu Beginn der Belichtung kurz zu, um dann bis etwa zur achten Belichtungsstunde auf einen konstanten Wert abzusinken, welcher bis zum Ende des Ergrünungsexperimentes weitgehend beibehalten wird. Die Unterteilung der Carotine in die bei Dunkelheit akkumulierten azyklischen Carotine und die zyklischen Carotine zeigt, daß mit der Abnahme der azyklischen Vorstufen das Auftreten und die Zunahme von zyklischen Carotinen verbunden ist. Die Synthese der zyklischen Carotine liegt jedoch weit unter der Rate, mit welcher die azyklischen Carotine

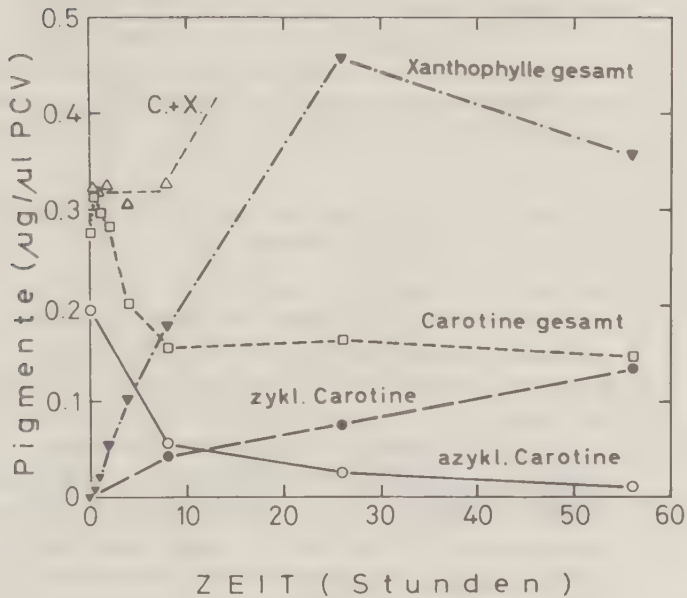


Abb. 10: Veränderungen in der Carotinoid-Zusammensetzung der Scenedesmus Mutante C-6D während der Ergrünung in weißem Mischlicht von 15000 Lux bei 30 °C. Die Trennung der Carotinoide erfolgte im System B nach Hager und Meyer-Bertenrath (1966) und Williams (1971).

abnehmen. Die Differenz ist zu erklären aus der ebenfalls nach Belichtung eintretenden Xanthophyllsynthese aus den gebildeten zyklischen Carotinen. Eine Addition von Gesamt-Carotinen und Gesamt-Xanthophyllen ergibt, daß während der ersten vier bis sechs Ergrünungsstunden keine Netto-Synthese von Carotinoiden stattfindet, sondern eine Umwandlung bereits vorhandener Vorstufen in die auftretenden Endstufen des Syntheseweges.

In Abb. 11 sind die chromatographisch getrennten Carotine einzeln aufgeführt.

Aus der Abbildung geht hervor, daß die in Abb. 10 zu sehende geringe Zunahme der Gesamt-Carotine zu Beginn der Belichtung mit der Zunahme von ξ -Carotin korreliert. Die Vermutung liegt nahe, daß diese ξ -Carotin-Zunahme auf einer Umwandlung der stärker gesättigten Carotinoidvorstufen Phytoen und Phytofluen in ξ -Carotin beruht und daß die Neuanlieferung des auf diesem Wege synthetisierten ξ -Carotins die Umwandlung von ξ -Carotin in die Folgeprodukte der Carotinoid-Biosynthesekette während dieser Zeit übertrifft. Da in diesem Experiment die farblosen, fluoreszierenden Carotine Phytoen und Phytofluen quantitativ nicht verfolgt wurden, kann ein Beweis für diese Annahme jedoch nicht angetreten werden.

Im weiteren Verlauf der Ergrünung nehmen die Carotinoid-Vorstufen ab und sind nach 56 Stunden Belichtungszeit nur noch in Spuren vorhanden.

β -Carotin, das in größten Mengen synthetisierte Carotin, nimmt während der Ergrünung ständig zu. Der Gehalt an α -Carotin dagegen nimmt nur während der Anfangsphase der Ergrünung zu, um anschließend bis auf geringe Spuren abzusinken.

Die Xanthophyllsynthese setzt zwar unmittelbar

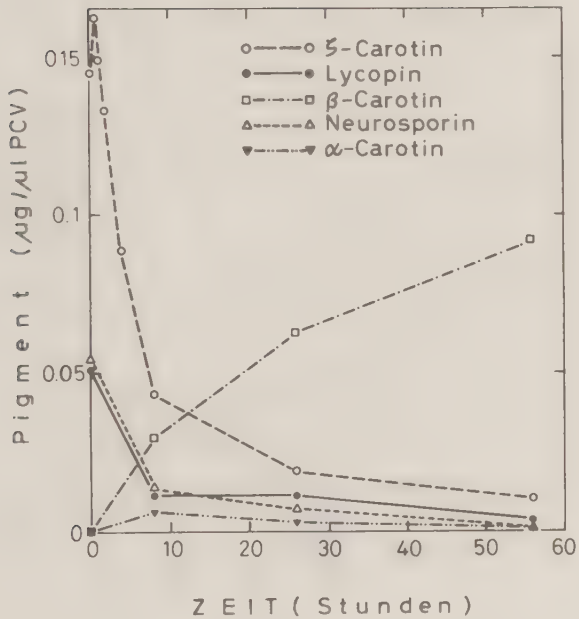


Abb. 11: Veränderung in der Zusammensetzung der Carotine während der Ergrünung der Scenedesmus Mutante C-6D in weißem Mischlicht von 15000 Lux bei 30 C.
Zur Trennung siehe Legende Abb. 10.

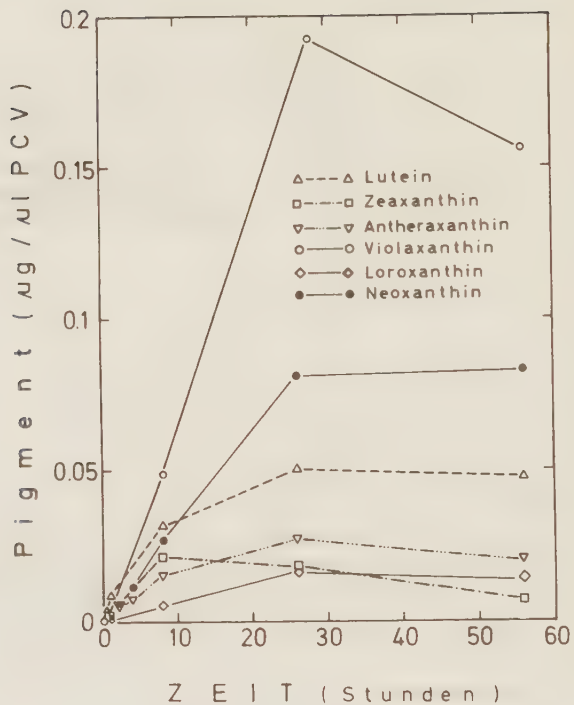


Abb. 12a: Veränderungen in der Zusammensetzung der Xanthophylle während der Ergrünung der Scenedesmus Mutante C-6D unter weißem Mischlicht von 15000 Lux bei 30°C. Die Auftrennung der Xanthophylle erfolgte in den Systemen A und B nach Hager und Meyer-Bertenrath (1966).

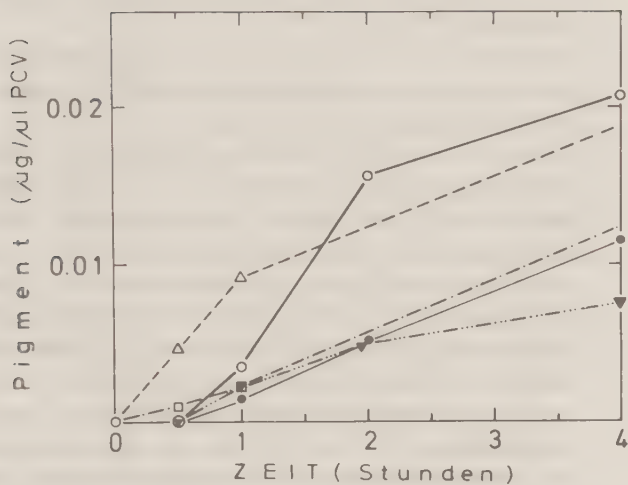


Abb. 12b: Die Abbildung stellt den vergrößerten Ausschnitt der ersten vier Ergrünungsstunden aus Abb. 12a dar. Die Vergrößerung dient zur Verdeutlichung der zeitlichen Reihenfolge des Auftretens der verschiedenen Xanthophylle. Nähere Einzelheiten siehe Legende Abb. 12a

nach Belichtungsbeginn ein; jedoch treten die höher oxidierten Xanthophylle in deutlicher zeitlicher Reihenfolge auf (Abb. 12 a und b).

Als erste Xanthophylle sind die di-Hydroxy-Carotinoide Lutein und Zeaxanthin im Chromatogramm erfaßbar.

Zu dieser Zeit (nach 1/2 Stunde Belichtungsdauer) sind die höher oxidierten Xanthophylle noch nicht im Chromatogramm auszumachen.

Erst nach 1 Stunde treten Antheraxanthin, Violaxanthin und Neoxanthin im Chromatogramm auf (Abb. 12 a).

Der stärkste Anstieg ist insgesamt beim Violaxanthin zu verzeichnen, welches während der Ergrünung zum Hauptcarotinoid wird. Bis auf Zeaxanthin, das bereits nach der 8. Ergrünungsstunde wieder abnimmt, nehmen die Xanthophylle bis zur 26. Stunde zu.

Bezogen auf das Zellvolumen (PCV) nehmen Violaxanthin und Antheraxanthin anschließend ab, während die Xanthophylle Neoxanthin, Lutein und Loroaxanthin in ihrer Konzentration weitgehend konstant bleiben.

3.2.2.3. Zwischenbilanz

Tabelle 2 faßt noch einmal in qualitativer und quantitativer Gegenüberstellung die in den Abbildungen 6 a und b; 8; 9; 10a und b dargestellten, während der Ergrünung eintretenden Veränderungen zusammen.

Durch Einwirkung von Licht kommt es im Verlaufe der Ergrünung der Scenedesmus-Mutante C-6D, nach einer anfänglichen lag-Phase zu einer Synthese des in Dunkelheit nicht vorhandenen Chlorophyll b. Chlorophyll a, in Dunkelheit bereits vorhanden, wird ebenfalls nach einer ca. 2-stündigen lag-Phase zusätzlich synthetisiert. Während der Ergrünung nimmt das Chlorophyll insgesamt, bezogen

Tabelle 2:		
Pigment	in µg/ml PCV	
	Dunkel-Kultur	Ergrünte Kultur
Phytoen	vorhanden	(Spuren)
Phytofluon	vorhanden	(Spuren)
5-Carotin	155,7	10
Proneurosporin	15,1	-
cis-Neurosporin	21,6	-
all-trans-Neurosporin	20	(Spuren)
Prolycopin	17,3	-
poly-cis-Lycopin III	22,7	-
poly-cis-Lycopin	11,3	-
cis-Lycopin	3,2	-
all-trans-Lycopin	1,9	3
α-Carotin	-	(Spuren)
β-Carotin	-	92
Gesamt-Carotine *	(269,8) 276,3	(105) 140
Lutein	-	47
Zeaxanthin	-	6,7
Antheraxanthin	-	20
Violaxanthin	-	156
Loroxanthin	-	14
Neoxanthin	-	83
Gesamt-Xanthophylle *	-	358
Carotinoide gesamt *	(269,8) 276,3	(451) 501
Chlorophyll a	274,5	1350
Chlorophyll b	-	313
Gesamt-Chlorophylle	274,5	1663
Chlorophyll a/b *	-	-
Chlorophyll/Car.	-	-

Tab.2: Quantitativer Vergleich des Pigmentgehaltes der heterotrophen Dunkelkultur und einer für 56 Stunden unter 15000 Lux weißem Mischlicht, bei 30°C ergrünten Kultur der *Scenedesmus* Mutante C-6D. (Pigmentgehalt in µg/ml PCV)

* In Klammern: Pigmente als Summe der Einzelkomponenten nach vollständiger chromatographischer Trennung.
Ohne Klammern: Ausgangsmenge vor der Auftrennung. (S.dazu auch S.57 oben.)

auf die Dunkelkultur um das Sechsfache zu, wobei ca. ein Sechstel aus der Chlorophyll b-Synthese stammt. Das Chlorophyll a/b-Verhältnis nähert sich während der Ergrünung mit einem Wert von 4,31 dem für Scenedesmus obliquus Wildtyp beschriebenen Wert, der zwischen 4 - 4,5 liegt (SENGER, 1968).

Unter Umbau der akkumulierten, stark gesättigten Carotinoid-Vorstufen setzt unmittelbar nach Einsetzen der Belichtung die Bildung der Folge- und Endstufen des Carotinoid-Syntheseweges ein. Eine Neusynthese von Carotinoiden findet jedoch erst nach der vierten Ergrünungsstunde statt und kann zur achten Ergrünungsstunde erfaßt werden. Am Ende des Ergrünungsexperimentes ist das Carotinoidmuster der Mutante dem des Scenedesmus Wildtyps sehr ähnlich (HAGER und STRANSKY, 1970 a; CZYGAN, 1968).

Die für 56 Stunden ergrünnten Algen sind gekennzeichnet durch das völlige Fehlen der cis-Isomeren der Carotinoid-Vorstufen und die nur noch in sehr geringen Mengen nachweisbaren all-trans-Formen der in Dunkelheit akkumulierten Vorstufen.

Im Gegensatz zur Dunkelkultur enthält die ergrünte Kultur (56. Std. Licht) jedoch die bizyklischen Carotine α - und β -Carotin und alle im Wildtyp vorkommenden Xanthophylle. Der Anteil von Lutein ist jedoch im Vergleich zum Wildtyp relativ niedrig, während Violaxanthin in größeren Mengen als im Wildtyp (MELL, 1977) vorhanden ist.

Extrapoliert man den weiteren Verlauf der Kurven in Abb. 12, so kann eine weitere Veränderung des Carotinoid-Musters in Richtung auf die Carotinoid-Zusammensetzung im Wildtyp nach der 56. Stunde angenommen werden.

Differenzen, die zwischen addierten Einzelcaro-

tinoiden und Gesamtcarotinoiden bestehen (z.B. Abb.10, S.49, besonders jedoch Tab.2, S.55), sind methodisch bedingt:

Die Gesamt-Carotine wurden vor der weiteren Auftrennung in die Einzelkomponenten bestimmt. Bei der Auftrennung, in der die isolierten Mischbanden zum Teil noch zwei oder drei weiteren Chromatographieschritten unterzogen wurden, kann es zu Verlusten an eingesetztem Material von insgesamt bis zu 25% kommen.

Ein Vergleich der beschriebenen Ergebnisse mit Resultaten, die CLAES an der Chlorella-Mutante 5/520, die bei Dunkel-Anzucht eine mit der dunkel-kultivierten Scenedesmus-Mutante C-6D vergleichbare Pigmentzusammensetzung aufweist, fand, zeigte eine gewisse Parallelität der Veränderungen im Carotinoid-Muster (CLAES, 1957; CLAES, 1958). CLAES konnte dort zeigen, daß mit der Abnahme der akkumulierten Carotinoide Phytoen, Phytoflu ζ -Carotin, Proneurosporin und Prolycopin die Synthese des monozyklischen β -Zeaxanthin (auch als Carotin x bezeichnet), der bizyklischen Carotine α - und β -Carotin und der Xanthophylle einsetzte und zog daraus den Schluß, daß die in Dunkelheit akkumulierten Carotine direkte Vorstufen der neusynthetisierten Carotinoide seien.

Wegen der Photosensitivität der Chlorella-Mutante 5/520 mußten die Ergrünungsexperimente jedoch unter sehr schwachem Licht durchgeführt werden (s. dazu DUBERTRET und JOLIOT, 1974). Dadurch bedingt konnte der in der Scenedesmus-Mutante C-6D nach ca. 26-stündiger Belichtung erreichte "Gleichgewichtszustand", in dem die Zunahme der Carotinoide zum Stillstand kommt, für die Chlorella-Mutante 5/520 auch nach 72-stündiger Belichtungszeit noch nicht erreicht werden. Vielmehr deuten alle von CLAES (1957 und 1958) veröffentlichten Daten darauf

hin, daß sich die Mutante 5/520 nach 72-stündiger Belichtung in einem Ergrünungszustand befindet, den die Scenedesmus-Mutante C-6D früher (etwa um die 10. Ergrünungsstunde) durchläuft. Die an der Scenedesmus-Mutante C-6D gewonnenen Ergebnisse sind im folgenden noch einmal zusammengefaßt:

1. Die in Dunkelheit akkumulierten Carotine sind Vorstufen im Biosyntheseweg der Carotinoide, aus denen die zyklischen Carotine gebildet werden.
2. Sie stellen auch ein frühes Reservoir von Xanthophyllvorstufen dar, denn die während der ersten 4-6 Stunden der Ergrünung gebildeten Xanthophylle müssen, da sich der Gesamtgehalt der in den Algen befindlichen Carotinoide nicht ändert, ebenfalls aus diesem pool von Vorstufen gebildet werden.
3. Die höher oxydierten Xanthophylle Antheraxanthin, Violaxanthin, Neoxanthin werden aus den geringer oxydierten Vorstufen Lutein und Zeaxanthin gebildet, was durch die zeitliche Abfolge ihres Auftretens belegt wird (Abb. 12 a und b).
4. Die Zyklisierungsreaktion der Carotinoide ist ein lichtabhängiger Schritt im Biosyntheseweg dieser Pigmente, der bei Belichtung unmittelbar einsetzt.

Im folgenden soll nun die Entwicklung des Photosyntheseapparates der Mutante C-6D untersucht werden, um mögliche Beziehungen zwischen Pigmentsynthese und Entwicklung der die Pigmente aufnehmenden funktionellen Strukturen zu untersuchen.

3.2.3. Entwicklung der Photosynthesereaktionen

3.2.3.1. Reaktionen ganzer Zellen

3.2.3.1.1. Photosynthese und p-Benzochinon-Hill-Reaktion

Nach Überführen der in Dunkelheit gewachsenen Algen, die keine Photosynthesekapazität, nur geringe Chlorophyllmengen und Carotinoid-Vorstufen besitzen, setzt sofort, ohne lag-Phase eine Entwicklung der als Sauerstoffentwicklung im Oxygraph meßbaren Photosynthesekapazität ein (Abb. 13).

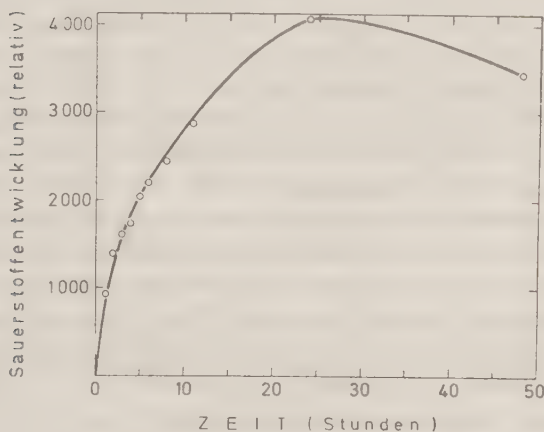


Abb. 13: Entwicklung der Photosynthesekapazität während der Ergrünung der *Scenedesmus* Mutante C-6D in Weißlicht von 15000 Lux bei 30 °C. Die Messungen der photosynthetischen O₂-Produktion erfolgten polarographisch im Oxygraph in Warburg-Puffer Nr.9. Die Suspensionsdichte wurde auf 10 µl PCV/ml eingestellt.

Die Hill-Reaktion mit p-Benzochinon (p-BQ) ist eine an ganzen Zellen meßbare Teilreaktion der Photosynthese. Sie ist eine rein von PS II abhängige Reaktion, in der Wasser als natürlicher Elektronendonator wirkt. p-BQ nimmt die über PS II angeregten Elektronen wahrscheinlich im Bereiche des Plastochinon-Pools ab (FRICKEL-FAULSTICH, 1974), was aus der Hemmbarkeit der p-BQ-Hill-Reaktion mit DBMIB gefolgert wird.

Die als relative Sauerstoffproduktion/PCV nicht abgebildete Entwicklung der Hill-Reaktion mit p-BQ verläuft der Entwicklung der Photosynthesekapazität parallel, erreicht jedoch nur ca. 50% der Intensität der Photosynthesereaktion. Die entsprechenden auf Chlorophyll bezogenen Werte werden in Abb. 14 in Verbindung mit der auf Chlorophyll bezogenen photosynthetischen Sauerstoffentwicklung dargestellt und können dieser Abbildung entnommen werden. Eine ohne lag-Phase einsetzende Entwicklung der Photosynthesekapazität wurde von HERRON und MAUZERALL (1972) an der ergrünenden Chlorella-Mutante 610-y festgestellt. Diese Chlorella-Mutante besitzt jedoch im Gegensatz zur Scenedesmus-Mutante C-6D bereits bei Dunkel-Anzucht eine zwar geringe, aber deutlich meßbare Photosynthesekapazität. Demgegenüber zeigt die Ergrünung der Scenedesmus-Mutante C-2A' (SENGER und BISHOP, 1972; SENGER et al., 1974) eine kurze, aber deutliche lag-Phase sowohl für die Entwicklung der Hill-Aktivität, als auch für die Entwicklung der Photosynthesekapazität.

Die beiden Mutanten (Chlorella vulgaris 610-y und Scenedesmus obliquus C-2A') unterscheiden sich von der Scenedesmus-Mutante C-6D dadurch, daß sie bei Dunkelheit erheblich weniger Chlorophyll pro Zelle bzw. PCV (bezogen auf die voll ergrünte Kultur) besitzen, als C-6D. Außerdem besitzt die

Mutante C-2A' alle auch im Wildtyp vorhandenen Carotinoide (eigene Untersuchungen), was wahrscheinlich für die Chlorella-Mutante 610-y ebenfalls zutrifft (die veröffentlichten Spektren deuten darauf hin; HERRON, MAUZERALL, 1972), jedoch nicht von den Autoren ausdrücklich erwähnt wurde.

In beiden Mutanten (Chlorella 610-y und C-2A') wird im Gegensatz zur Mutante C-6D schon nach sehr kurzer Entwicklungszeit (ca. 10 Stunden) maximale Photosynthesekapazität erreicht, und zwar bevor die Chlorophyllsynthese ihr Maximum erreicht hat. Die Hill-Reaktion mit p-BQ erreicht bei der Mutante C-2A' ebenfalls nur ca. 50% des Wertes der Photosynthesekapazität (BISHOP und SENGER, 1972). Theoretisch wäre eine der Photosynthesereaktion entsprechende Sauerstoffentwicklung zu erwarten, da bei der Messung der Hill-Reaktion mit p-BQ eine Trennung der PS II-Reaktion von möglicherweise limitierenden Dunkelreaktionen (außer denen der Wasserspaltung) erfolgt.

Bezogen auf den Chlorophyllgehalt der Zellen (Abb. 14) zeigen Photosynthesekapazität und p-BQ-Hill-Reaktion bei Mutante C-6D den gleichen Verlauf.

Nach einem sehr steilen Anstieg erreichen die Reaktionen in der sehr frühen Ergrünungsphase ihr Maximum (ca. 2. - 3. Stunde), gefolgt von einem anfangs stark ausgeprägten Abfall. Beide Reaktionen erreichen etwa zur 24. Stunde ein Gleichgewichtsniveau.

Wie schon im Zusammenhang mit Abb. 13 erwähnt, erreicht die Hill-Reaktion den theoretisch denkbaren Wert nicht. Messungen von Photosynthese und Hill-Reaktion im gleichen Puffer (Sörensen, 0,05 M pH 7,5) ergaben eine zu Beginn der Ergrünung zwar ebenfalls geringere Hill-Reaktion, nach ca. 12

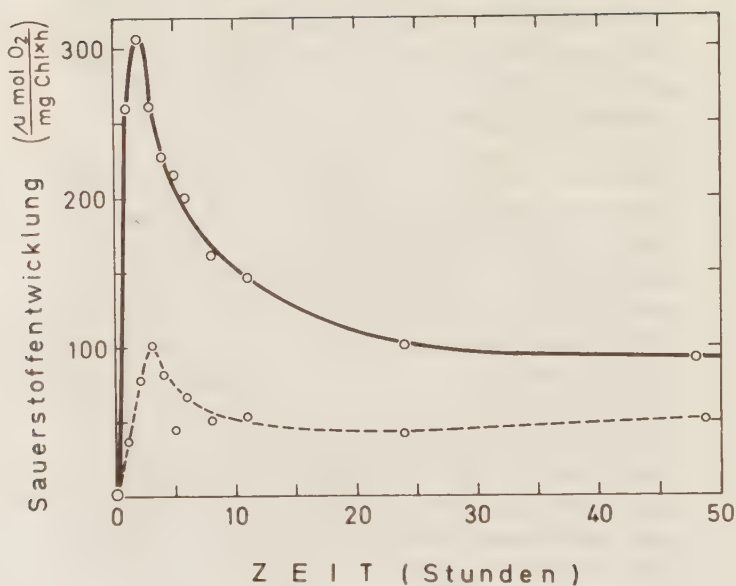


Abb. 14: Photosynthetische Sauerstoffentwicklung und Sauerstoffentwicklung der Hill-Reaktion mit p-Benzochinon bezogen auf Chlorophyll während der Ergrünung der Scenedesmus Mutante C-6D unter Weißlicht von 15000 Lux bei 30 °C. Die Sauerstoffmessung erfolgte polarographisch im Oxygraph. Die Hill-Reaktion wurde in Sörensen-Puffer pH 7,5, die Photosynthese in Warburg-Puffer Nr.9 gemessen.

Photosynthese —————
Hill-Reaktion - - - - -

Stunden waren jedoch beide Reaktionen gleich stark. In Sörensen Puffer erreichten die auf Chlorophyll bezogenen Reaktionen außerdem ihr Maximum genau zur gleichen Ergrünungsstunde, so daß der unteroptimale Verlauf und die geringe Verschiebung der Maxima zwanglos durch die Messung beider Reaktionen in verschiedenen Puffern erklärt werden kann. Ausschlaggebend für die auf den ersten Blick möglicherweise ungünstig erscheinende Wahl der Puffer war die Tatsache, daß

a) Die Hill-Reaktion mit p-BQ nicht im alkalischen Warburg-Puffer Nr. 9 gemessen werden kann, da bei dem pH dieses Puffers ($\approx 8,0$) bereits Polymerisierungsreaktionen des p-Benzochinons ablaufen,

b) die Photosynthese im Phosphatpuffer nach Sörensen, in welchem die p-BQ-Hill-Reaktion gemessen wurde, während der ersten zwölf Ergrünungsstunden eine sehr starke Abhängigkeit von dem in der Atmung der Algen entwickelten CO_2 zeigte.

Diese Abhängigkeit kam unter anderem darin zum Ausdruck, daß die Photosynthesekurve (O_2 -Entwicklung relativ pro PCV, entsprechend Abb. 13) zur gleichen Zeit wie die Atmung (s. Abb. 20), nämlich um die 3. - 4. Stunde der Ergrünung bereits ein Maximum durchlief und erst zur 8. Stunde wieder einen Anstieg zeigte. Das Gleichgewichtsniveau, nach dessen Erreichung keine Steigerung der Photosynthesekapazität mehr erfolgte, wurde dann ebenfalls nach ca. 24 Ergrünungsstunden erreicht, lag jedoch um 50% unter dem in Warburg Puffer erreichten Wert.

Ein ähnlicher Verlauf, wie die in Abb. 14 dargestellte Entwicklung der Photosynthesekapazi-

tät pro Chlorophyll wurde von STERN et al. (1964) bei der Ergrünung von Euglena gefunden. De GREEF et al. (1971) finden die gleiche Entwicklung an ergrünenden Bohnenblättern, EGNEUS et al. (1972) an etiolierten Gerste-Blättern und HENNINGSEN und BOARDMAN (1973) an ergrünenden Gerste-Keimlingen. Den genannten Autoren zufolge reflektiert dieser Verlauf der Kurve (Photosynthesekapazität pro Chlorophyll) Veränderungen in der Zahl und Größe der Photosynthese-einheiten. Danach werden zu Anfang der Ergrünung bevorzugt kleine Photosynthese-einheiten neu angelegt (Reaktionszentren). Die Sauerstoffentwicklung bezogen auf Chlorophyll erreicht somit sehr hohe Werte.

Während des weiteren Ergrünungsverlaufes werden den Photosynthese-einheiten bevorzugt Antennenpigmente hinzugefügt (OELZE-KAROW und BUTLER, 1971; HENNINGSEN und BOARDMAN, 1973), wodurch die Effektivität der Lichtreaktion gesteigert wird und die Organismen in die Lage versetzt werden, schon bei niedrigen Lichtintensitäten über optimale Photosynthesekapazität zu verfügen.

Wegen des zum Teil sehr unterschiedlichen Gebrauchs des Begriffes "Photosynthese-einheit" in der Literatur wird der Begriff hier festgelegt als die morphologische und funktionelle Einheit des Pigment-systems I (PS I) oder - II (PS II).

Wenn auch in der untersuchten *Scenedesmus*-Mutante C-6D zu Beginn der Ergrünung überwiegend die Reaktionszentren angelegt und erst später die Lichtreaktionen durch Hinzufügen der Antennenpigmente optimiert werden, sollte sich dieses auch in Unterschieden zwischen Lichtsättigungskurven der Photosynthese zu verschiedenen Ergrünungszeiten ausdrücken (HERRON und MAUZERALL, 1972). In Lichtsättigungskurven repräsentiert der lineare

Anstieg der Kurve die Effizienz der Lichtreaktionen, während der lichtunabhängige Sättigungsbereich limitierende Dunkelreaktionen reflektiert.

Die zu unterschiedlichen Ergrünungszeiten aufgenommenen Lichtsättigungskurven der Photosynthese (Abb. 15) zeigen folgendes Bild:

Nach einer Stunde Ergrünung sind die photosynthetischen Lichtreaktionen noch limitierend. Dem anfangs etwas steileren Anstieg der Kurve folgt ein linearer Teil, der auch bei sehr hohen Lichtintensitäten ($10^6 \text{ erg/cm}^2 \times \text{sec}$) noch kein Sättigungsniveau erreicht.

Zwischen den Lichtsättigungskurven von erster und dritter Ergrünungsstunde besteht eine erhebliche Differenz, während sich die Lichtsättigungskurven von 3. und 5. Stunde speziell in ihrem linearen Anstieg nur noch unwesentlich unterscheiden. Da die Lichtreaktionen in dieser Zeit eine hohe Effektivität erreicht haben - der Sättigungsbereich wird in der 5. Ergrünungsstunde bei einer mit dem Wildtyp vergleichbaren sättigenden Lichtintensität von $3 \times 10^5 \text{ erg/cm}^2 \times \text{sec}$ erreicht - muß bereits in einer sehr frühen Ergrünungsphase neben der Bildung von Reaktionszentren auch eine Organisation der Antennen mit bereits vorliegenden, oder parallel synthetisierten Pigmenten einsetzen.

Mit anderen Worten: Nur während der sehr frühen Phase der Ergrünung (angezeigt durch den anfangs sehr steilen Anstieg der O_2/Chl -Kurve (Abb. 14) und dem ständigen Anstieg der Lichtsättigungskurve der ersten Ergrünungsstunde (Abb. 15) überwiegt die Bildung von Reaktionszentren, die parallel dazu anlaufende Vervollständigung der Antennen von vorhandenen oder neu gebildeten Reaktionszentren.

Die abknickende Lichtsättigungskurve deutet darauf hin, daß bereits zum Zeitpunkt der Messung Antennen

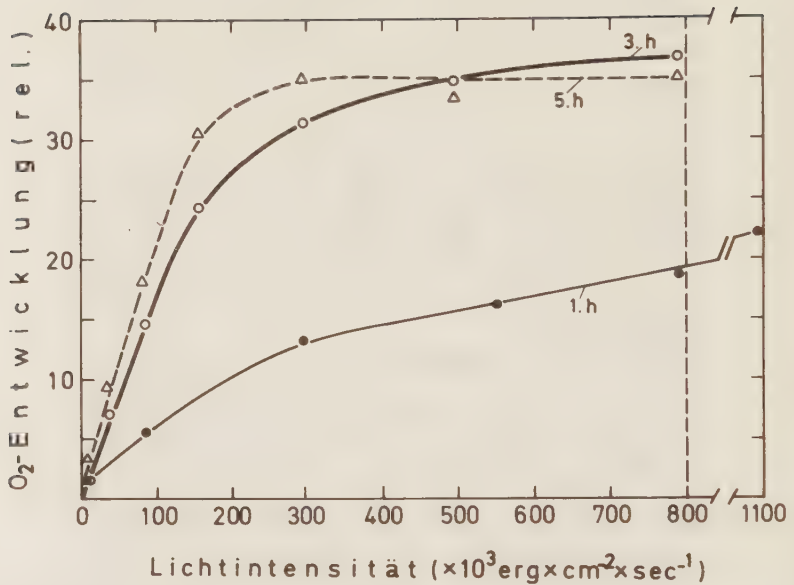


Abb. 15: Lichtintensitätskurven, gemessen zu verschiedenen Ergrünungszeiten der Scenedesmus Mutante C-6D.

Die Messung erfolgte polarographisch im Oxygraph als O₂-Entwicklung, wobei die Algen in Warburg-Puffer Nr.9 in einer Dichte von 10 µl PCV/ml suspendiert waren.

angelegt worden sind und entweder einige durch Elektronentransportketten verbundene Einheiten von PS II und PS I schon so effektiv arbeiten, daß sie durch Dunkelreaktionen (möglicherweise im Bereich der Elektronentransportkette) limitiert werden, oder die Photosyntheseeinheiten insgesamt schon durch Zuführung von Antennenpigmenten so weit angewachsen sind, daß Dunkelreaktionen - wenn auch schwach - beginnen, einen begrenzenden Einfluß auszuüben.

3.2.3.1.2. Fluoreszenzinduktion (Kautsky-Effekt)

3.2.3.1.2.1. Die Fluoreszenzinduktionskurve

Chloroplasten dunkeladaptierter Grünalgen oder Höherer Pflanzen zeigen bei plötzlich einsetzender, konstanter Belichtung typische Schwankungen in der Intensität der Chlorophyllfluoreszenz (Kautsky-Effekt) (KAUTSKY und HIRSCH, 1931; BAUER und FRANCK, 1974). Die charakteristischen Kurventeile der Fluoreszenzinduktionskurve (Abb. 16), werden verschiedenen Vorgängen im PS II und in der Elektronentransportkette zugeordnet.

Die Grundfluoreszenz (gestrichelte Linie) stellt sich in weniger als 10^{-9} sec. ein. Sie wird als Fluoreszenzstrahlung der weiter vom Reaktionszentrum entfernten Chlorophyll-Moleküle aus dem Antennenbereich von PS II und PS I aufgefaßt.

Die variable Fluoreszenz ist ein Maß für die besetzten, nicht arbeitsfähigen Reaktionszentren von PS II. Sie ist stark abhängig von Vorgängen auf der reduzierenden Seite von PS II.

Folgende charakteristische Kurventeile der variablen Fluoreszenz werden in der Literatur beschrieben und interpretiert (BAUER, 1974; GOVINDJEE und PAPAGEORGIOU, 1971).

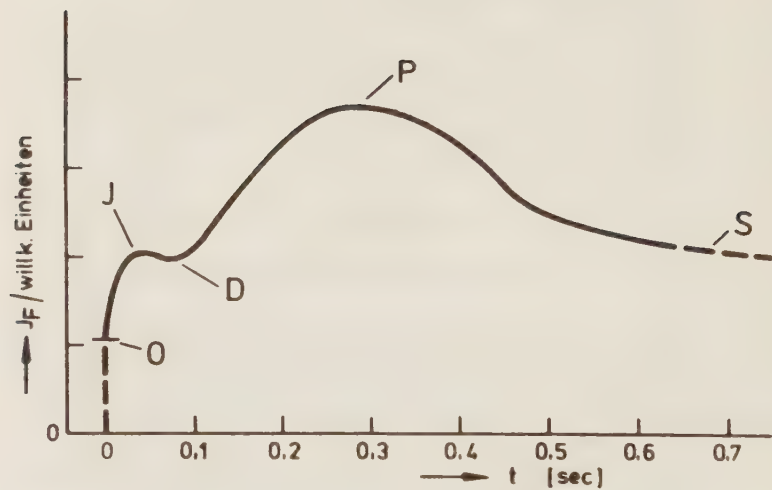


Abb.16: Typischer Verlauf einer Fluoreszenzinduktionskurve. Die Buchstaben dienen zur Charakterisierung typischer Kurvenmerkmale (aus Bauer 1972).

O - J : Der erste, schnelle Fluoreszenzanstieg

Er zeigt zwei Vorgänge in PS II an

- a) die Aktivierung und Besetzung der Reaktionszentren und
- b) das Anlaufen temperaturabhängiger chemischer Dunkelreaktionen z.B. Oxydation des Quenchers Q durch Plastochinon.

J - D : Der Übergang in die erste Depression

Verursacht wird die erste Depression durch den Abtransport negativer Ladung vom und zum PS I

D - P : Der Anstieg zum Maximum

Der unter J - D beschriebene Abtransport negativer Ladung zum Photosystem I ist gleichzusetzen mit einer Verringerung der durch PS I produzierten Elektronenlücken. Wahrscheinlich wegen der Erschöpfung eines Redoxsystems der Elektronentransportkette kommt es zu einer vorübergehenden völligen Reduktion des Plastochinonpools und Q.

P - S : Die zweite Depression

Eine einwandfreie Deutung dieses zweiten Fluoreszenzabfalles ist bis heute noch nicht gelungen. Die Depression wird allgemein mit einer ansteigenden Aktivität von PS I in Verbindung gebracht.

S : Der stationäre Zustand

zeigt an, daß sich die photochemischen Licht- und Dunkelreaktionen nun in einem Gleichgewicht befinden.

3.2.3.1.2.2. Veränderungen in der Fluoreszenzinduktionskurve während der Ergrünung

Die Fluoreszenzinduktionskurven von dunkelkultivierten Algenzellen der Scenedesmus-Mutante C-6D zeigen keines der Merkmale einer typischen Induktionskurve (Abb. 17 und besonders Abb. 18 a).

Das erhaltene Signal ist rechteckig und zeigt keine lichtinduzierbaren Fluoreszenzänderungen. Zugabe der Hemmstoffe DBMIB und DCMU, die durch Unterbrechung des Elektronenflusses nach PS II normalerweise eine Fluoreszenzsteigerung bewirken, zeigt keinen Effekt auf die Fluoreszenzintensität. Die Form der Fluoreszenzkurve und die Effektivität der zugegebenen Hemmstoffe zeigen das völlige Fehlen von PS II-Aktivität an.

Erst von der zweiten Ergrünungsstunde an kann eine schwache Veränderung in der Fluoreszenzinduktionskurve wahrgenommen werden. Verbunden ist mit dieser Veränderung auch eine Erhöhung der Fluoreszenz durch Zugabe von DBMIB und DCMU.

Die Fluoreszenzkurve der vierten Ergrünungsstunde zeigt den typischen Verlauf der Induktionskurve während der frühen Phase der Ergrünung. Charakterisiert ist die Kurve - und das gilt ebenfalls für die Induktionskurven der 8. und 12. Stunde (Abb. 17 und 18 b) - durch eine sehr starke erste Depression. Nach der unter 3.2.3.1.2.1. gegebenen Interpretation deutet der Fluoreszenzabfall auf eine sehr starke PS I-Aktivität während dieser frühen Ergrünungsphase hin.

Das Signal der 24. Stunde zeigt einen typischen Verlauf der Induktionskurve und damit das Vorhandensein eines intakten und ausgewogenen Photosyntheseapparates an. Die sich im Verlaufe der Ergrünung ändernde Höhe des Fluoreszenzsignals

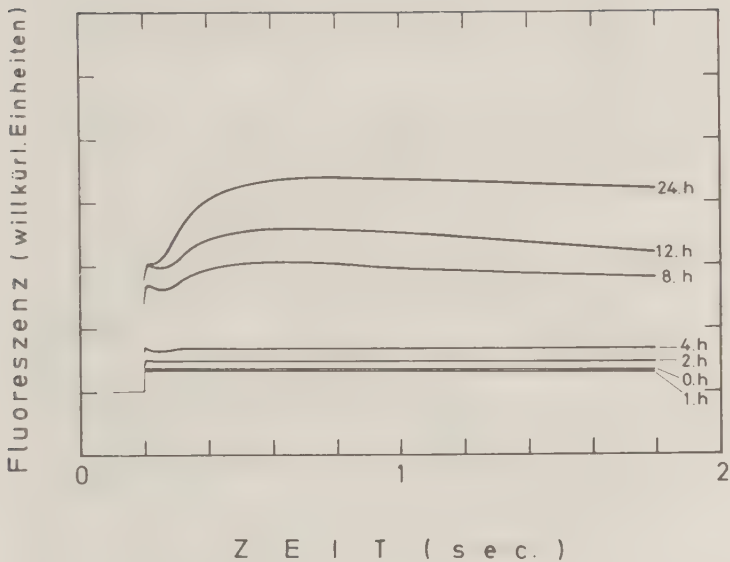


Abb. 17: Fluoreszenzinduktionskurven von verschiedenen Ergrünungsstadien der Scenedesmus Mutante C-6D. Die Mutanten waren in heterotrophem Nährmedium suspendiert, die Suspensionsdichte betrug 3 μ l PCV/ml. Die Fluoreszenz wurde mit einem Aminco DW-2 Photomultiplier gemessen, wobei das Signal direkt auf einen Speicheroszillographen gegeben und von dort mit einer Polaroidkamera aufgenommen wurde (s.a. Methoden, 2.11.)

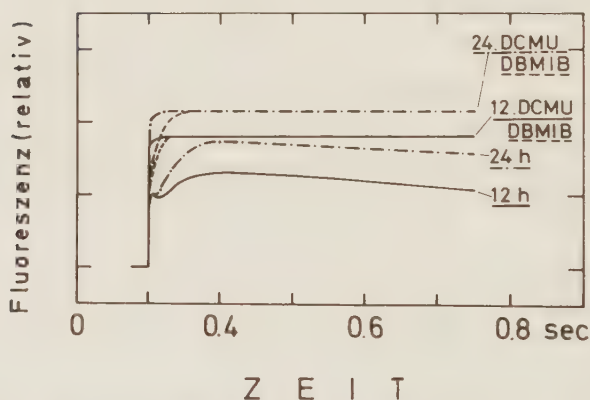
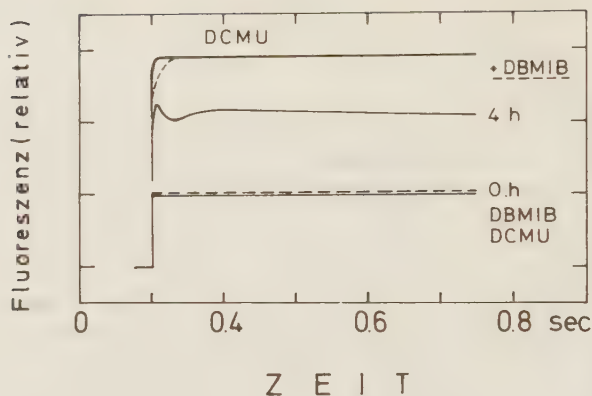


Abb. 18a und b: Fluoreszenzinduktionskurven von verschiedenen Ergrünungsstadien der Scenedesmus Mutante C-6D.

Die Mutante war in heterotrophem Nährmedium suspendiert; die Suspensionsdichte betrug 3 µl PCV/ml. DBMIB wurde in einer Endkonzentration von 10^{-5} M, DCMU in der Endkonzentration von 10^{-6} M zugegeben. Die Einwirkzeit der Hemmstoffe betrug jeweils 10 min. Meßbedingungen wie in Abb. 15.

stützt die Befunde der oben (3.2.3.1.1.) geschilderten Experimente.

Zu Beginn der Ergrünung, zu einem Zeitpunkt, in welchem keinerlei Photosystem II-Aktivität vorhanden ist (s. Hill-Reaktion mit p-BQ) tritt ein rechteckiges Signal bestimmter Höhe auf, welches bis zur 1. Ergrünungstunde kaum zunimmt. Diese Grundfluoreszenz repräsentiert das in den Zellen vorhandene, nicht aktive Chlorophyll und - vorausgesetzt die oben getroffene Annahme, daß zu Anfang der Ergrünung sehr rasch die Reaktionszentren angelegt werden, sei richtig - die Größe der vorhandenen Photosyntheseeinheiten.

Im weiteren Verlauf der Ergrünung kommt es zu einer starken Erhöhung der Grundfluoreszenz (Abb. 15) bis etwa zur 12. Stunde, was einer Vergrößerung der Photosyntheseeinheiten durch Vervollständigung der Antennen entspricht.

Die Vervollständigung der Antennen ist ca. zur 12. Stunde abgeschlossen; denn die über 24 Stunden ergrünte Kultur zeigt die gleiche Grundfluoreszenz. Die starke Ausprägung von PS I-Aktivität in der Fluoreszenzinduktionskurve weist darauf hin, daß die Elektronentransportkette bereits zu frühen Ergrünungszeiten effektiv arbeitet.

Durch die bei Hemmstoffzugabe induzierten Veränderungen der Fluoreszenzkurve sind zusätzlich relative Aussagen über die Größe des aktiven Plastochinonpools möglich (FRICKEL-FAULSTICH, 1974). DBMIB greift als Hemmstoff nach dem Plastochinonpool an (BÖHME et al., 1971; LOZIER und BUTLER, 1972), so daß nach Zugabe dieses Hemmstoffes der Quencher Q und Plastochinon noch durch PS II reduziert werden können, bevor die maximale Fluoreszenz auftritt (s. z.B. Abb. 18 a oder b). In diesem Falle zeigt die Fluoreszenzkurve nach dem ersten steilen Anstieg eine schwächere

Fluoreszenzzunahme als bei Zugabe des zweiten eingesetzten Hemmstoffes DCMU. DCMU übt seine Hemmwirkung nach dem Quencher, d.h. vor Plastochinon aus. Mit Einsetzen der Belichtung wird Q sofort reduziert, die Elektronen können nicht mehr zum PQ abfließen, und die Fluoreszenz erreicht demnach sofort ihren maximalen Wert. Die Fläche zwischen den Fluoreszenzinduktionskurven nach DBMIB- und anschließender DCMU-Hemmung kann als relatives Maß für die Größe des reduzierbaren Plastochinons dienen.

Die unter gleichen Meßbedingungen erfolgte Aufnahme der Fluoreszenzkurven unter Einsatz der erwähnten Hemmstoffe (Abb. 18 a und b) zeigt, daß dieser Pool zur vierten Ergrünungsstunde deutlich feststellbar ist und bis zur 24. Stunde weiter zunimmt.

3.2.3.1.3. Quantenbedarf

Die Messung des Quantenbedarfs während der Ergrünung der Mutante C-6D (Abb. 19) ergibt einen sehr hohen Wert zu Beginn der Ergrünung und einen Abfall bis etwa zur 12. Stunde. Der sehr hohe Quantenbedarf zu Beginn der Ergrünung beruht darauf, daß (wahrscheinlich) wegen des Fehlens der PS II-Aktivität keine (oder nur eine sehr geringe) Photosynthese meßbar ist. Die Verhältnisse liegen hier also anders als bei der Mutante C-2A', deren hoher Quantenbedarf auf einer mangelnden Kopplung zwischen den beiden Photosystemen beruht (BISHOP und SENGER, 1972). Eine Korrelation zwischen Quantenbedarf und der Lichtintensitätskurve der C-6D Algen nach der ersten Ergrünungsstunde ist insofern möglich, als auch die Linearität und der flache Verlauf der Lichtintensitätskurve eine sehr ineffektive Lichtnutzung zur photosynthetischen Sauerstoffentwicklung anzeigen.

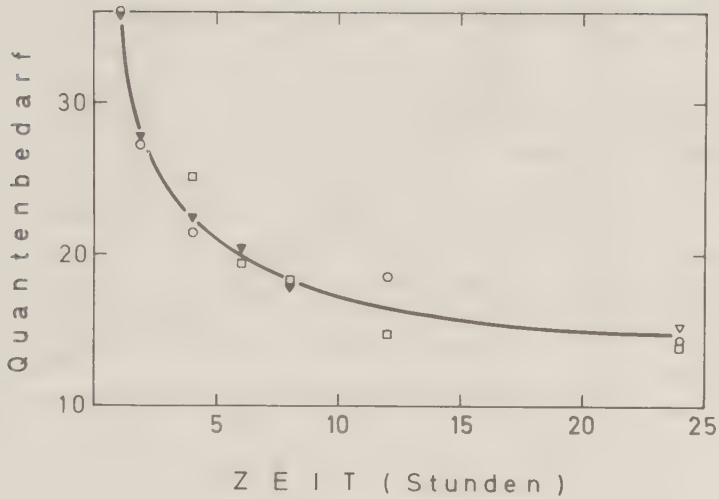


Abb. 19: Quantenbedarf der photosynthetischen Sauerstoffentwicklung während der Ergrünung der Scenedesmus Mutante C-6D unter Weißlicht von 15000 Lux bei 30°C. Die Messung erfolgte in monochromatischem Licht der Wellenlänge 679 nm und der Intensität von $4 \times 10^3 \text{ erg} \times \text{cm}^{-2} \times \text{sec}^{-1}$. Eingesetzt wurden 60 µl PCV/ml in Warburg-Puffer Nr. 9.

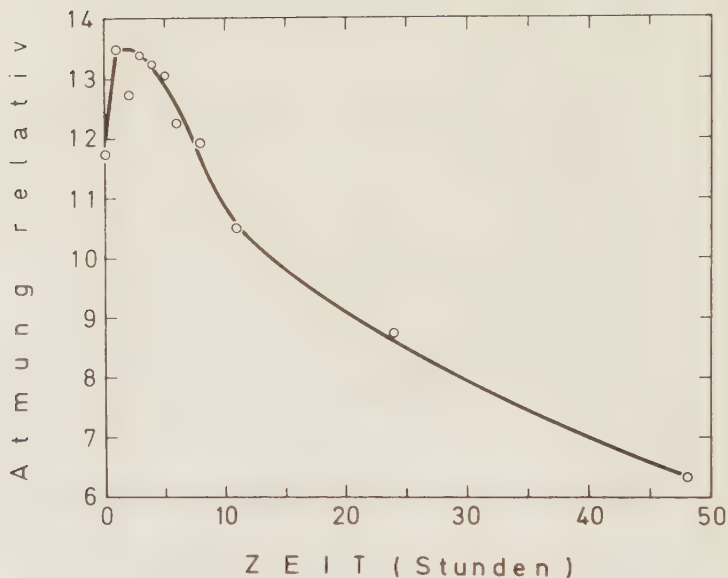


Abb. 20: Verlauf der Atmung während der Ergrünung der Scenedesmus-Mutante C-6D unter weißem Mischlicht von 15 000 Lux bei 30° C.

Die Atmung wurde polarographisch im Oxygraph als Sauerstoffaufnahme in Dunkelheit gemessen.

Die Suspensionsdichte der Kultur betrug 10 μ l PCV/ml.

3.2.3.1.4. Atmung

Die parallel zur Ergrünung als Sauerstoffverbrauch bei Dunkelheit im Oxygraph gemessene Atmung zeigt während der ersten Ergrünungsstunden eine deutliche Steigerung. Nach der 3. bis 4. Stunde folgt ein Absinken der Kurve (Abb. 20) bis zum Ende des Ergrünungsexperimentes. Eine ähnliche Atmungssteigerung wurde von SENGGER und BISHOP (1972) an der Scenedesmus-Mutante C-2A' festgestellt. Begleitet wurde die Atmungssteigerung von einem Kohlenhydrat-Abbau.

In beiden Mutanten reichen die zu Beginn der Ergrünung über die Photosynthese bereitgestellten energiereichen Substrate nicht aus, um den Gesamtbedarf an Energie für die verschiedenen anlaufenden Syntheseprozesse zu decken.

3.2.3.2. Reaktionen an zellfreien Systemen

3.2.3.2.1 Reaktionen von PS I

Aussagen über die Aktivität von Photosystem I lassen sich aus den bisherigen Untersuchungen nur indirekt ableiten. So weisen z.B. die Fluoreszenzinduktionskurven auf eine recht hohe PS I-Aktivität in frühen Ergrünungsstadien hin (Abb. 17, 18 b, 3.2.3.1.2.2.).

Das Auftreten von PS I-bedingten Merkmalen im variablen Bereich der Fluoreszenzinduktionskurven ist jedoch an die Aktion von PS II gebunden. Nur wenn PS II funktionsfähig ist, können Schlüsse auf die Wirkung von PS I gezogen werden (BAUER, 1972).

Wie die Entwicklung der Kapazität der p-BQ-Hill-Reaktion und die Fluoreszenzinduktionskurven zeigen (Abb. 10; Abb. 17, 18a), ist jedoch in den dunkel gewachsenen Algen keine PS II-Aktivität vorhanden.

Um eine Aussage darüber machen zu können, ob sich beide Photosysteme gleichzeitig entwickeln und somit der auf Chlorophyll bezogene Verlauf der Photosynthese während der Ergrünung (Abb. 14) durch die Entwicklung beider Photosysteme geprägt ist, oder ob sich die Entwicklung eines der beiden Photosysteme in der Photosynthese/Chlorophyll-Kurve limitierend auswirkt und die Photosynthese/Chlorophyll-Kurve somit die Entwicklung dieses Photosystems reflektiert, wurde eine genaue Untersuchung der PS I-Reaktion erforderlich.

Vorversuche, in denen die PS I-Aktivität als Photo-reduktion an ganzen Zellen gemessen wurde, ergaben widersprüchliche Resultate, welche methodisch bedingt waren. Aus diesem Grunde wurde eine Methode der PS I-Messung gewählt, die einen Aufbruch der Zellen und die Herstellung von Chloroplasten-Partikeln erforderte.

Eine Partikelherstellung dient vor allem dazu, die Diffusionsbarriere der Zellwand zu beseitigen, um den verwendeten Donor- und Akzeptorsystemen freien Zutritt zum Wirkungsort zu verschaffen. Die PS I-Aktivität wurde als Sauerstoffaufnahme von reduziertem Methylviologen (MV) gemessen, wobei reduziertes DCPIP als Elektronendonator diente. Das DCPIP wurde durch einen Überschuß an Ascorbat, welches selbst nicht an der Reaktion beteiligt ist (TREBST, 1974), reduziert gehalten. Um eine möglicherweise vorhandene schwache Rest-Reaktion von PS II auszuschalten, wurde den Proben der PS-II-Hemmstoff DCMU zugegeben.

Wie aus Abb. 2 hervorgeht, zeigen die im Dunkeln kultivierten Algen eine ausgesprochen hohe PS I-Aktivität bezogen auf Chlorophyll. Mit einer Höhe der Reaktion von ca. 6 500 μmol aufgenommenem O_2 /mg Chlorophyll $\times$ h liegt der Wert 6-7 mal höher als z.B. der von FLEISCHHACKER (1975) gemessene Wert der Reaktion an einer unter Starklichtbedingungen gewachsenen Kultur des Wildtyps der Alge oder 20mal höher als der von einer Schwachlichtkultur von *Scenedesmus*-Wildtyp. Zur 10. Ergrünungsstunde ist die Reaktion bezogen auf Chlorophyll auf ca. 1/6 des Ausgangswertes zurückgegangen. Im Vergleich zu dieser drastischen Veränderung erfolgt anschließend nur noch ein relativ geringes Absinken der Reaktion bis zum Endstand in der 50. Ergrünungsstunde. Eine derart intensive Reaktion bezogen auf Chlorophyll deutet an, daß in der Dunkelkultur eine Vielzahl von gut funktionierenden PS I-Reaktionszentren vorliegt, welchen im weiteren Verlauf der Ergrünung überwiegend akzessorische Pigmente zugefügt werden. Dadurch "verschlechtert" sich das Verhältnis von aufgenommenem Sauerstoff pro Chlorophyll, obwohl die eigentliche Lichtnutzung durch PS I effektiver wird.

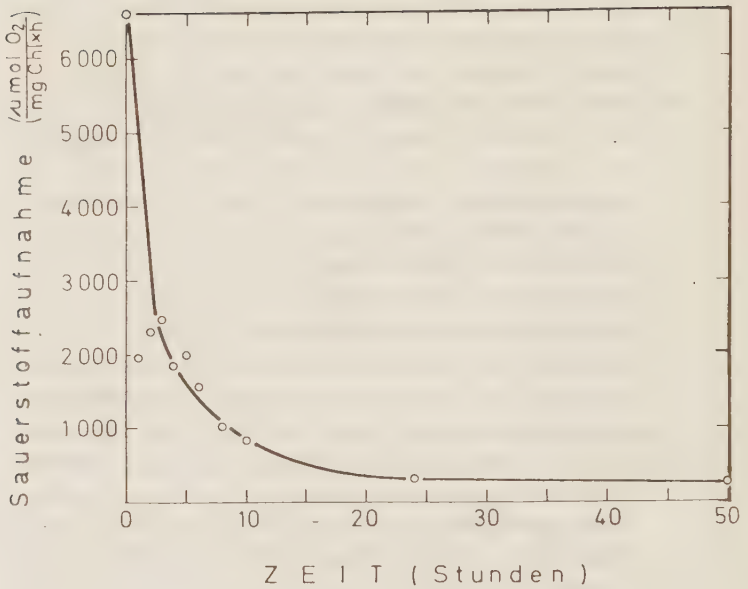


Abb. 21: Photosystem I-Reaktion während der Ergrünung der *Scenedesmus* Mutante C-6D unter Weißlicht von 15000 Lux bei 30°C. Die PS-I- Messung erfolgte polarographisch im Oxygraph als Sauerstoffaufnahme bei der Reaktion $\text{Asc.}/\text{DCPIP} \longrightarrow \text{MeV}$.

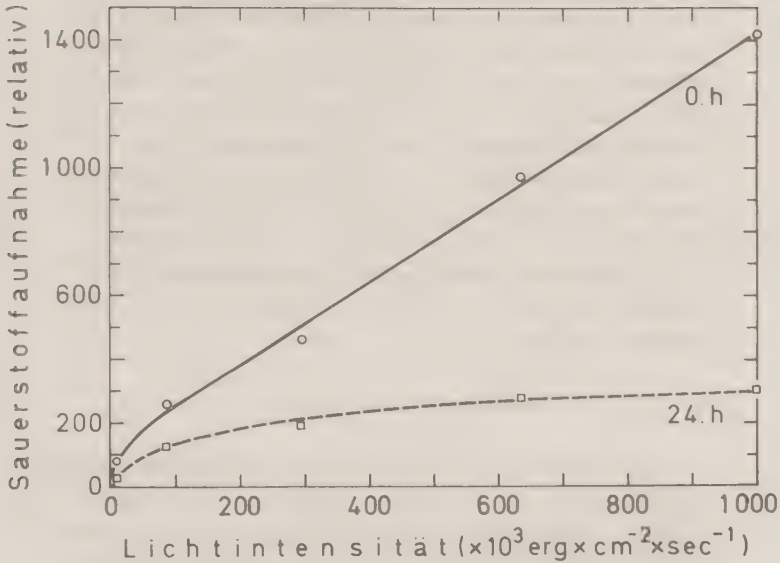


Abb. 22: Lichtsättigungskurven der PS I-Reaktion mit Ascorbat/DCPIP $\rightarrow$ MeV an Partikeln verschiedener Ergrünungsstadien. Die Aktivität wurde polarographisch, als Sauerstoffaufnahme durch MeV in Abhängigkeit von der Lichtintensität gemessen. Die Anregung von PS I erfolgte mit Rotlicht $> 620 \text{ nm}$.

Daß diese Annahmen berechtigt sind, kann durch die in Abb. 22 dargestellten Lichtsättigungskurven der PS I-Reaktion belegt werden. Die Lichtsättigungskurve der 0. Stunde zeigt jedoch, daß PS I auch in Dunkelheit schon einen beträchtlichen Teil funktionierender Antennen besitzen muß, was durch den bei niedrigen Lichtintensitäten relativ steilen Anstieg der Lichtsättigungskurve angezeigt wird. Die abgebildete Lichtsättigungskurve der 24. Stunde mag als Indiz dafür dienen, daß im Verlaufe der Ergrünung Veränderungen im PS I eintreten, die bewirken, daß die Kurve einen "normalen" Verlauf einnimmt, d.h. schon nach einer kurzen Anstiegsphase im Bereich geringer Lichtintensitäten das Sättigungsniveau erreicht.

3.2.3.2.2. Reaktionen von PS II

Die Untersuchungen von PS I an Chloroplastenpartikeln haben gezeigt, daß die Reaktionen dieses Photosystems keine limitierende Wirkung auf die photosynthetische Sauerstoffentwicklung haben können. Damit sind die limitierenden Reaktionen eindeutig dem Bereich von PS II zuzuordnen, was insbesondere durch die Hill-Reaktion an ganzen Zellen mit dem Hill-Reagenz p-Benzochinon, einem sehr nahe bei PS II wirkenden Elektronenakzeptor, angezeigt wird (FRICKEL-FAULSTICH, 1974).

Ob der Defekt in PS II im engeren Bereich des Pigmentsystems oder im Bereich der Wasserspaltung vorliegt, läßt sich ebenfalls nur an zellfreien Systemen untersuchen, da die künstlichen Donor-Akzeptorsysteme die Diffusionsbarriere der Zellwand nicht durchdringen können. Als Elektronendonator wurde bei dieser Untersuchung DPC eingesetzt, das in der Lage ist, seine Elektronen in

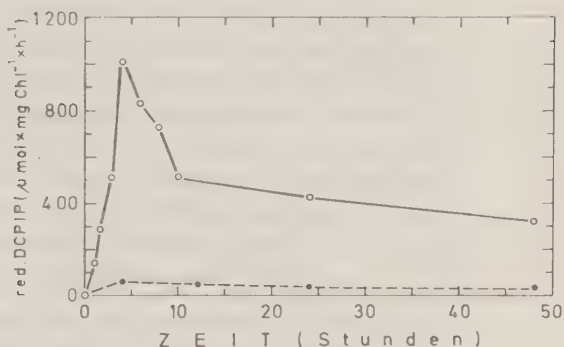


Abb. 23: DCPIP-Hill-Reaktion an Partikeln verschiedener Stadien einer ergrünenden Kultur der Scenedesmus Mutante C-6D. Die Ergrünung erfolgte in Weißlicht von 15000 Lux bei 30°C. Die Messung erfolgte in einem Aminco DW2-Spektralphotometer im Split-Beam-Verfahren. Die Intensität des Anregungslichtes (> 620 nm) betrug $2,8 \times 10^5 \text{ erg} \times \text{cm}^{-2} \times \text{sec}^{-1}$. DCPIP wurde in der Endkonzentration von 4×10^{-5} M, DPC in der Endkonzentration von 10^{-3} M eingesetzt.

(—○—): DCPIP-Hill-Reaktion ohne und mit DPC.

(●-----●): DCPIP-Hill-Reaktion Digitonin-behandelter Chloroplastenpartikel (s.3.2.4.3.)

PS II einzugeben. Liegt ein Defekt im Bereich des wasserspaltenden Systems vor, so tritt bei Einsatz von DPC in der DCPIP-Hill-Reaktion eine Steigerung der PS II-Reaktion ein. Abb. 23 zeigt den Verlauf der DCPIP-Hill-Reaktion/Chlorophyll an Chloroplastenpartikeln während der Ergrünung. Die Kurve repräsentiert die DCPIP-Hill-Reaktion ohne und mit Einsatz von DPC. Da DPC die Hill-Reaktion nicht steigert, liegt der limitierende Schritt bei der Entwicklung der Photosynthese im unmittelbaren Bereich des Pigmentsystems von PS II und nicht im Bereich der Wasserspaltung.

Lichtintensitätskurven, die im Bereich maximaler PS II-Reaktion bezogen auf Chlorophyll (Abb. 23) aufgenommen wurden, zeigen (Abb. 24), daß zur 4. Ergrünungsstunde zwar schon PS II-limitierende Dunkelreaktionen einen Einfluß ausüben, die Kurve jedoch im gemessenen Bereich keinem Sättigungswert zustrebt.

Chloroplastenpartikel der 24. und 48. Ergrünungsstunde erreichen schon bei einer niedrigen Lichtintensität ($1,5 \times 10^5 \text{ erg} \times \text{cm}^{-2} \times \text{sec}^{-1}$) ein Sättigungsniveau. Zu diesen Zeiten ist demnach PS II vollständig ausgebildet; die Lichtreaktionen laufen sehr effektiv ab und werden daher schon bei niedrigen Lichtintensitäten von Dunkelreaktionen limitiert.

Die Untersuchungen an ganzen Zellen und Chloroplastenpartikeln zeigen damit, daß die Entwicklung der Photosynthesekapazität Veränderungen im Bereich von PS II folgt.

Da während der Anfangszeit der Ergrünung keine Chlorophyllsynthese meßbar ist, kann diese Aktivierung entweder auf einer Veränderung vorhandenen Chlorophylls beruhen oder auf der Neusynthese einer anderen limitierenden Substanz oder Struk-

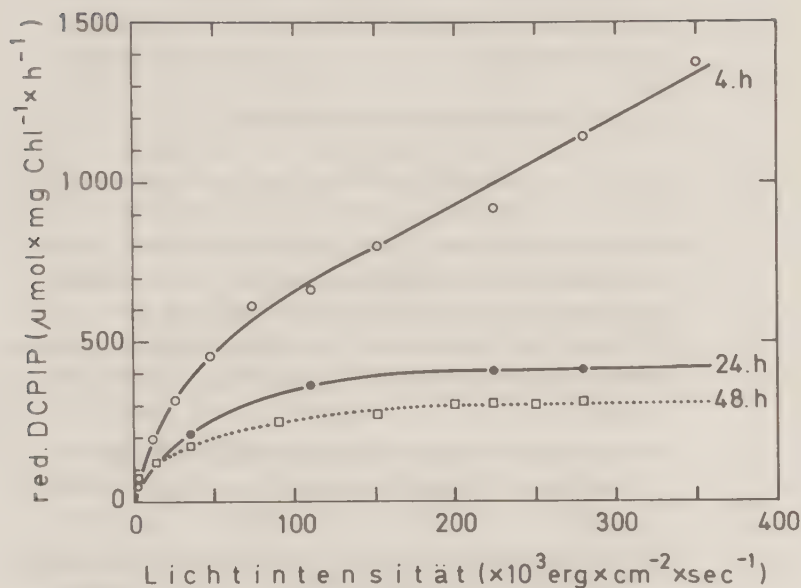


Abb. 24: Lichtintensitätskurven der DCPIP-Hill-Reaktion an Chloroplastenpartikeln verschiedener Stadien einer ergrünenden Kultur der Scenedesmus Mutante C-6D. Die Ergrünung erfolgte in Weißlicht vom 15000 Lux bei 30 C. Zur Messung siehe Legende von Abb. 23. DCPIP wurde in der Endkonzentration von 10^{-3} M eingesetzt.

tur.

Die Abb. 14 und 15, aus denen die Bildung von Reaktionszentren während der ersten Stunden der Ergrünung abgeleitet werden kann, reflektieren somit (PS I hat eine sehr hohe Aktivität) ausschließlich die Aktivierung oder Bildung von PS II-Zentren.

3.2.4. Entwicklung der Struktur

3.2.4.1. Methoden der Chloroplastenfraktionierung

In den vergangenen Jahren haben sich drei Hauptmethoden herauskristallisiert, die es erlauben, kleinste morphologische Untereinheiten der Chloroplasten (PS I und PS II-Partikel, Reaktionszentren und Chlorophyll-Proteinkomplexe) zu isolieren.

- a) Differentialzentrifugation von detergenzbehandelten Chloroplastenpartikeln (s.z.B. BOARDMAN et al., 1966; GRIMME, 1974).
- b) Dichtegradientenzentrifugation detergenzbehandelter Chloroplastenpartikel (s.z.B. VERNON et al., 1971; WESSELS, 1973).
- c) Gelelektrophorese von SDS-behandelten Thylakoidmembranen (s. z.B. THORNER, 1975; THORNER, 1976).

Bei der Anwendung der Dichtegradientenzentrifugation werden aus detergenzbehandelten Chloroplastenfragmenten - je nach untersuchtem Organismus - verschiedene Banden erhalten, die sich in ihrer spezifischen Dichte unterscheiden und in denen es zu einer Anreicherung von PS I oder PS II gekommen ist (VERNON et al., 1971; WESSELS, 1973; SIGALAT und DE KOUCHKOVSKY, 1974; HOFER et al., 1974).

3.2.4.2. Entwicklung der Banden im Saccharosegradienten

Die Anwendung einer von MELL (1977) zur Untersuchung von Synchronkulturen von Scenedesmus obliquus verwendeten Methode auf die ergrünende Scenedesmus-Mutante C-6D erbrachte in Vorversuchen deutliche und typische Unterschiede zum Wildtyp der Alge. Aus diesem Grunde wurde diese Methode als ein brauchbares Werkzeug zur Verfolgung struktureller Veränderungen in der Mutante C-6D während der Ergrünung angesehen und verwendet. Details zur Herstellung und Trennung der Partikel sind unter Methoden (2.9) aufgeführt. Die Auftrennung Digitonin-behandelter Chloroplastenpartikel verschiedener Ergrünungsstadien im kontinuierlichen Saccharosedichtegradienten ergab folgendes Bild (Abb. 25).

Während der Ergrünung treten charakteristische Veränderungen im Muster der in den Gradienten auftretenden Banden ein.

Die Trennung von Subpartikeln der Dunkelkultur (0.h) zeigt eine gelbe Bande (I) von geringer spezifischer Dichte im oberen Bereich des Gradienten, gefolgt von einer blaugrünen Bande (II). Beide Banden sind durch eine ungefärbte Zone getrennt. Während der ersten zwölf Ergrünungsstunden, so ergaben Gradiententrennungen der 4. und 8. Ergrünungsstunde, nähern sich Bande I und II immer weiter an. Ungefähr ab der 12. Stunde wird im unteren, dichten Teil des Gradienten eine zuerst noch schwach grün getönte Zone sichtbar. Bis zur 24. Ergrünungsstunde tritt eine Intensivierung und Verbreiterung der Bande II ein, eine weitere Bande (III) wird unterhalb von Bande II sichtbar, und die schwach grün gefärbte Zone im dichten Bereich des Gradienten hat sich zu einer

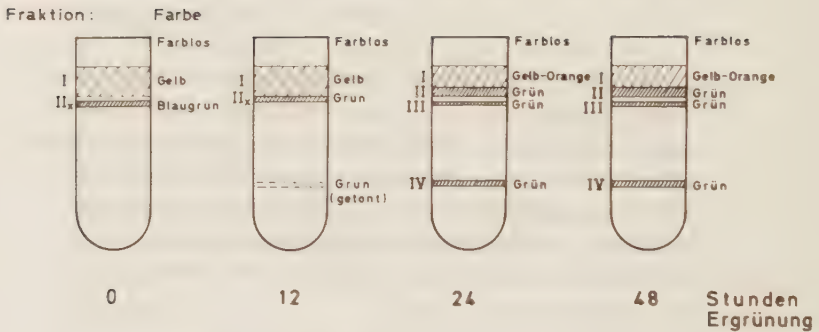


Abb. 25: Verteilung von Chloroplasten-Subpartikeln verschiedener Ergrünungsstadien im kontinuierlichen Saccharose-Dichtegradienten. Die Subpartikel wurden durch Digitonin-Behandlung von Chloroplastenfragmenten erhalten. Die Konzentration des Gradienten betrug am Ende der oberen Fraktion jeweils 10 % und am Boden des Zentrifugen-Röhrchens 66%. Die Zentrifugationsdauer betrug 14 Stunden bei 113000xg.

gefärbten Bande (IV) entwickelt. Das Bild des Gradienten der voll ergrüntes Kultur ist bis auf das zusätzliche Vorliegen der Bande III mit dem Muster des Scenedesmus-Wildtyps identisch (MELL, 1977). Um die in den einzelnen Banden vorliegenden Thylakoidbestandteile genauer zu charakterisieren, wurden die Reaktionen und die Pigmentzusammensetzungen der Banden ermittelt. Die beschriebenen Banden werden im folgenden als Partikelfraktionen (I-IV) bezeichnet.

3.2.4.3 Reaktionen der Partikelfraktionen

Die Reaktionen der im Saccharosegradienten erhaltenen Banden sind in Tabelle 3 dargestellt. Danach kann generell gesagt werden, daß die aus der Dunkelkultur erhaltenen Partikelfraktionen I und II nur PS I-Aktivität aufweisen, was nach den Untersuchungen an zellfreien Systemen (s. 3.2.3.2.1.) auch zu erwarten war. Die PS I-Aktivität ist jedoch in Fraktion I im Vergleich zu Literaturwerten (SIGALAT und DE KOUCHKOVSKY, 1974) recht hoch. Die Fraktion II_x kann aufgrund ihres schwer zu deutenden Verhaltens im Gradienten nicht mit Fraktion II der 48. Stunde verglichen werden. Ihre Aktivität beträgt nur 5% des Fraktion I-Wertes, ist aber trotzdem nicht zu vernachlässigen. In Fraktion I und II wird Fluoreszenz, gemessen bei 680 nm, nur durch Chlorophyll a angeregt. Dieses Fluoreszenzverhalten wird jedoch unter 3.2.4.6. noch genauer behandelt.

Im Gegensatz zur 0. Stunde sind im Gradienten der 48. Stunde zusätzliche Fraktionen vorhanden, die eine deutliche PS II-Aktivität zeigen.

Fraktion I enthält zur 48. wie zur 0. Stunde ausschließlich eine sehr hohe PS I-Aktivität. Die PS I-Aktivitäten der Fraktionen II, III, IV sind

Fraktion	Reaktion	0. h	48. h
I	PS I	9972	6406
	PS II $H_2O \rightarrow$ DCPIP	-	-
	PS II DPC $\rightarrow$ DCPIP	-	-
	Fluoreszenzanregung bei 450 nm	keine	gering
II	PS I	489,9	211,5
	PS II $H_2O \rightarrow$ DCPIP	-	10,7
	PS II DPC $\rightarrow$ DCPIP	-	42,79
	Fluoreszenzanregung bei 450 nm	keine	stark
III	PS I		84,87
	PS II $H_2O \rightarrow$ DCPIP		20,93
	PS II DPC $\rightarrow$ DCPIP	nicht vorhanden	39,9
	Fluoreszenzanregung bei 450 nm		stark
IV	PS I		75,24
	PS II $H_2O \rightarrow$ DCPIP		25,46
	PS II DPC $\rightarrow$ DCPIP	nicht vorhanden	21,17
	Fluoreszenzanregung bei 450 nm		stark
Roh-partikel	PS I	3866	458,1
	PS II $H_2O \rightarrow$ DCPIP	-	319,3
	PS II DPC $\rightarrow$ DCPIP	-	315,1
	Fluoreszenzanregung bei 450 nm	-	stark
Roh-partikel nach Digitonin-behandlung	PS I	4127	611,1
	PS II $H_2O \rightarrow$ DCPIP	-	36,29
	PS II DPC $\rightarrow$ DCPIP	-	34,98
	Fluoreszenzanregung bei 450 nm	-	stark

Tab. 3: Reaktionen der Partikelfractionen der Dichtegradientenzentrifugation von Digitonin-behandelten Chloroplastenfragmenten einer 3 Tage alten Dunkel-Kultur und einer für 48 Stunden in Weißlicht von 15000 Lux bei 30 °C ergrünt Kultur der Scenedesmus Mutante C-6D.
(Fortsetzung nächste Seite)

PS I wurde polarographisch im Oxygraph als Sauerstoffaufnahme bei MeV-Reduktion gemessen und dargestellt als

$$\mu \text{ Mol O}_2 \times \text{mg Chl}^{-1} \times \text{h}^{-1}.$$

PS II wurde als DCPIP-Hill-Reaktion spektral-photometrisch im Aminco DW2 im Split-Beam-Verfahren ohne und mit DPC als Elektronendonator für PS II gemessen. Die Darstellung erfolgte als $\mu\text{Mol red. DCPIP} \times \text{mg Chl}^{-1} \times \text{h}^{-1}$. Die Endkonzentration der eingesetzten Substanzen betrug:

$$\text{DCPIP} = 4 \times 10^{-5} \text{ M}$$

$$\text{DPC} = 10^{-3} \text{ M}$$

$$\text{DCMU} = 5 \times 10^{-6} \text{ M}$$

Die Fluoreszenzanregung wurde den Anregungsspektren der einzelnen Banden entnommen (s. Abb. 27-30).

relativ gering, so daß der Schluß erlaubt ist, daß die genannten Fraktionen von PS I relativ befreit sind. Wie ein Vergleich der Aktivitäten von Chloroplasten-Rohpartikeln und Digitonin-behandelten Partikeln zeigt (Abb. 23, Kap. 3. 2.3.2.2.), ist die niedrige PS II-Aktivität auf die Einwirkung von Digitonin zurückzuführen. Während in den leichteren PS II-haltigen Fraktionen durch Zugabe von DPC, einem Elektronendonator für PS II, eine Steigerung der Reaktion erreicht wird, sinkt die Reaktion mit DPC in Bande IV schwach ab. Wahrscheinlich ist durch Digitonin-Einwirkung das wasserspaltende System in den leichten Fraktionen II und III geschädigt, während dies in Fraktion IV nicht der Fall ist. Das Absinken der Reaktion in Fraktion IV nach DPC-Zugabe beruht höchstwahrscheinlich auf dem schädigenden Einfluß des Äthanol, in dem das DPC gelöst ist.

3.2.4.4. Pigmentzusammensetzung der Gradienten-Fractionen

Wie schon aus der Färbung der Banden zu sehen ist, liegen in ihnen die im Chloroplasten vorhandenen Pigmente in unterschiedlichen Konzentrationen vor. Die durch Ausschütteln mit einem Aceton-Petroleumbenzingemisch 1:1 gewonnenen Pigmente wurden mehrfach zur Entfernung von Saccharose- und Digitonin-Resten gewaschen. Nach Trennung im Scheidetrichter wurde der Pigmentextrakt der jeweiligen Gradienten-Fraktion zur Trockne eingedampft, in Aceton aufgenommen und dünnschichtchromatographisch getrennt. Die Identifizierung und quantitative Bestimmung der getrennten Pigmente erfolgte nach den in 2.3. beschriebenen Methoden.

Tabelle 4 zeigt die Unterschiede in der Pigmentzusammensetzung der Partikel-Fractionen von Dunkel-Kultur und vollständig ergrünter Kultur.

Auffällig ist sowohl bei Fraktion I der 0. Stunde, als auch bei Fraktion I der 48. Stunde, daß sich in diesen spezifisch leichten Fractionen ein so hoher Carotinoid-Anteil befindet. Da die Carotinoide und andere lipophile Substanzen allgemein spezifisch leichter sind als Proteine, wird es im oberen Teil des Gradienten zu einer unspezifischen Anreicherung von Carotinoiden und Lipiden, die bei der Vorbehandlung der Chloroplastenpartikel freigesetzt wurden, gekommen sein. Damit ist nicht gesagt, daß die Carotinoide in freier Form im Medium suspendiert sind. Es ist vielmehr wahrscheinlich, daß der größte Teil von ihnen an hydrophobe Bereiche von Proteinen gebunden ist, da die "gelösten" Lipide einschließlich der Carotinoide in einer schmalen Zone auf dem Top-Layer des Gradienten schwimmen.

Für Fraktion I kann daher nur das hohe Chl a/b-

Fraktion	Pigment in CHL A		Chl. a		Chl. b		Chl. a/b		Chlorophyll Carotenoids	
	Chl. a	Chl. b	Chl. a	Chl. b	Chl. a	Chl. b	Chl. a/b	Chl. a/b	Chlorophyll	Carotenoids
I	23	20,8	15,8	3,5	48,57				9,1%	
u. b. II	12,1	1,78	3,48	0,404	14,6				3,03	
Ganze Zellen	26,8	12,45	7,29	17,6	0,83				1,6%	
I										
IC										
hH, h III										
IV										
Ganze Zellen										

Tab. 4: Pigmentzusammensetzung der Partikel-Fraktionen einer Dichtegradienten-zentrifugation von Digitonin-behandelten Chloroplastenfragmenten.
Die Fraktionen stammen von einer 3 Tage alten Dunkel-Kultur und einer für 48 Stunden in Weißlicht von 15 000 Lux bei 30° C ergrünt Kultur Scenedesmus Mutante C-6D.
Die durch Ausschütteln gewonnenen Pigmente wurden dünnschichtchromatographisch in den Systemen A (modifiziert) und B nach Hager und Meyer-Bertrath (1966) und Williams (1971) getrennt und aus ihren Absorptionsspektren bestimmt.

Verhältnis zur Charakterisierung der Fraktion herangezogen werden.

Fraktion I enthält sehr wahrscheinlich weitgehend angereicherte PS I-Partikel. Dies gilt sowohl für Fraktion I der 0. (hier liegt nur Chl a vor) als auch der 48. Stunde. Dafür sprechen die sehr hohe PS I-Aktivität der Bande und das hohe Chl a/b-Verhältnis von 7,15. GRIMME (1974) konnte aus Chlorella PS I-Partikel mit einem Chl a/b-Verhältnis von 4,9 isolieren. Dabei ist zu berücksichtigen, daß das Verhältnis Chl a/b in den ganzen Zellen von Chlorella bei 2,7 - 2,9 lag. Fraktion II_x ist eine Bande mit geringer PS I-Aktivität und sehr hohem Chl a-Gehalt. Dies kann so gedeutet werden, daß entweder in der Fraktion I überwiegend Reaktionszentren von PS I ohne Antennenpigmente vorliegen, wodurch eine sehr hohe Aktivität bezogen auf Chlorophyll erhalten wird und Fraktion II komplette PS I-Partikel mit Antennenpigment-Komplexen enthält, oder daß Fraktion I komplette PS I-Partikel mit Antennenpigmenten enthält und Fraktion II_x fast reine, nur Chlorophyll a-enthaltende Antennenpigment-Protein-Komplexe enthält, die mit PS I verunreinigt sind.

Dabei wird jedoch die Annahme zugrunde gelegt, daß in der Dunkelkultur Antennenpigmentkomplexe von PS I vorhanden sind und daß sie spezifisch schwerere Proteine enthalten als die Reaktionszentren selbst.

Das unter 3.2.4.2. geschilderte Verhalten der Bande II_x, das zu einem Ineinanderübergehen der Bande I und II_x führt, zeigt, daß entweder Bande II_x spezifisch leichter, oder Bande I spezifisch schwerer wird. Wegen des Antagonismus von Carotinoiden und Proteinen bezüglich ihres spezifischen Gewichtes würde das bedeuten, daß Fraktion I durch neu synthetisierte schwere Proteinfractionen spe-

zifisch schwerer, oder Fraktion II_x durch Anlagerung von Lipiden (möglicherweise Carotinoiden) spezifisch leichter würde. Die aus der ergrünten Kultur erhaltene Fraktion II zeigt eine geringe PS I-Aktivität und bei Zugabe von DPC eine relativ starke PS II-Aktivität. Sowohl diese Tatsache, als auch das niedrige Verhältnis von Chlorophyll a/b weisen auf eine Anreicherung von PS II hin. Sowohl Fraktion III als auch Fraktion IV enthalten noch eine geringe PS I-Aktivität, jedoch eine deutliche PS II-Aktivität, was ebenfalls auf eine PS II-Anreicherung hinweist. Ungewöhnlich ist in beiden Fraktionen der hohe Chlorophyll a-Anteil. Eine detaillierte Deutung der einzelnen Fraktionen ist bei MELL (1977) zu finden.

3.2.4.5. Absorptions- und fluoreszenzspektroskopische Charakterisierung der Banden

Die im kontinuierlichen Saccharosegradienten aus Detergenz-behandelten Chloroplastenfragmenten erhaltenen Fraktionen besitzen typische Absorptions- und Fluoreszenzanregungsspektren. Dabei stützen die Absorptionsspektren die bei der Pigment-Trennung erhaltenen Befunde, während die Fluoreszenzanregungsspektren es erlauben, funktionelle Beziehungen zwischen den Pigmenten herzustellen. Diese funktionellen Beziehungen können aufgrund folgender Beobachtungen hergestellt werden: in vivo-Fluoreszenzemissionsspektren von Grünalgen und Höheren Pflanzen sind charakterisiert durch Emissionsmaxima bei Wellenlängen oberhalb von 680 nm, welche ausschließlich durch Chlorophyll a-Fluoreszenz hervorgerufen werden (GOVINDJEE, 1971). Zeigt nun ein Fluoreszenzanregungsspektrum, bei dem die Chlorophyll a-Fluoreszenz bei einer

Wellenlänge von 685 nm in Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge gemessen wird, daß Licht oberhalb 450 nm, welches nicht von Chlorophyll a absorbiert wird, eine Chlorophyll a-Fluoreszenz hervorruft, so muß der Schluß gezogen werden, daß ein oder mehrere Pigmente, welche bei Wellenlängen oberhalb 450 nm absorbieren, ihre Anregungsenergie auf Chlorophyll a übertragen können und damit eine Steigerung der Chlorophyll a-Fluoreszenz bewirken.

Wegen meßtechnischer Schwierigkeiten, die genaue Fluoreszenzmessungen an ganzen Zellen verhinderten, konnten Fluoreszenzanregungsspektren nur von Partikel-Fractionen aufgenommen werden. Da die Partikel-Fractionen jedoch eine sehr unterschiedliche Pigmentzusammensetzung aufwiesen, stellten sie ein brauchbares Material für die Untersuchungen dar.

Die im folgenden abgebildeten Absorptions- und Fluoreszenzanregungsspektren erlauben einen Vergleich zwischen den Absorptions- und Fluoreszenzanregungseigenschaften der in den verschiedenen Partikelfractionen enthaltenen Pigmente (Abb. 25 und 26 für die Dunkelkultur, 27, 28, 29, 30 für die voll ergrünte Kultur).

Das Absorptionsspektrum von Fraktion I der Dunkelkultur (Abb. 25 a) ist geprägt durch die Absorptionsmaxima des akkumulierten β -Carotins, die Schulter bei 475 nm wird durch das vorhandene Lycopin bewirkt und beruht auf der Überlagerung der Absorption von cis-Formen und all-trans-Form. Im Rotbereich ist ein Chlorophyllpeak mit Absorptionsmaximum bei 672 nm vorhanden, der nicht weiter strukturiert ist und somit das Vorhandensein von nur einer oder einer im Überschuß in dieser Fraktion befindlichen Chlorophyll a-Form anzeigt.

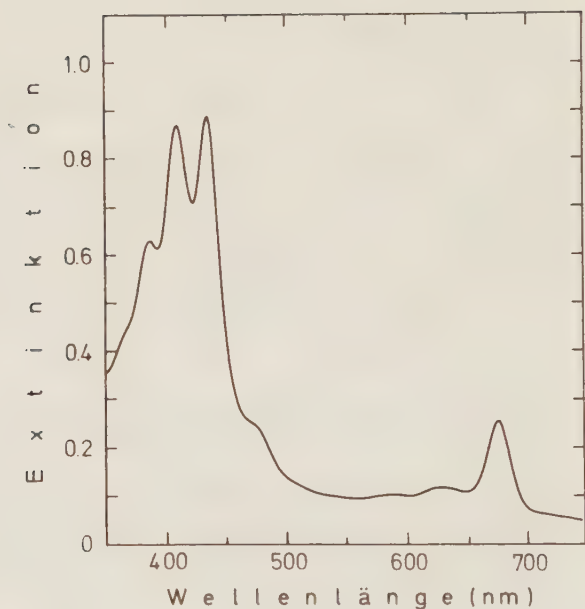


Abb. 25 a: Absorptionsspektrum bei Raumtemperatur der Fraktion I einer Dichtegradientenzentrifugation von Digitonin-behandelten Chloroplastenpartikeln, erhalten aus einer Dunkelkultur der Scenedesmus-Mutante C-6D. Das Absorptionsspektrum wurde in einem Shimadzu MPS-5000 aufgenommen.

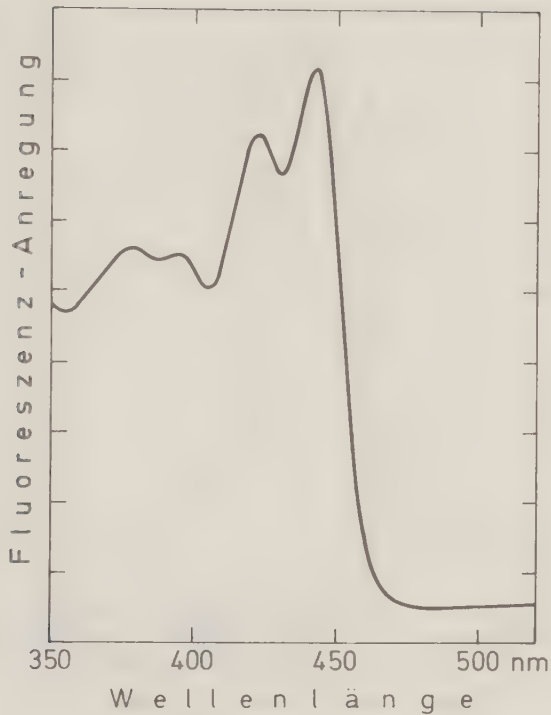


Abb. 25 b: Fluoreszenzanregungsspektrum bei Raumtemperatur der Fraktion I einer Dichtegradientenzentrifugation von Digitonin-behandelten Chloroplastenpartikeln der Scenedesmus Mutante C-6D.

Das Spektrum wurde in einem automatisch auf quantengleiches Licht korrigierenden Shimadzu RF-50 Fluorimeter gemessen. Die Messung der Emission erfolgte bei 680 nm.

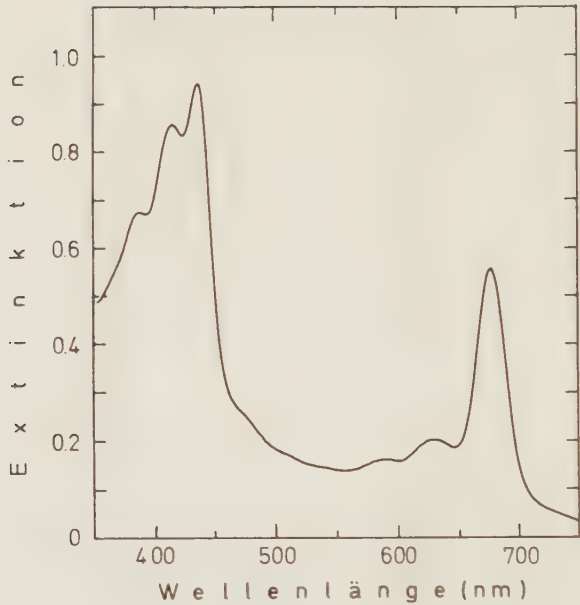


Abb. 26 a: Absorptionsspektrum bei Raumtemperatur der Fraktion IIx einer Dichtegradientenzentrifugation von Digitonin-behandelten Chloroplastenpartikeln, erhalten aus einer Dunkelkultur der Scenedesmus-Mutante C-6D. Das Absorptionsspektrum wurde in einem Shimadzu MPS 5000 Spektralphotometer aufgenommen.

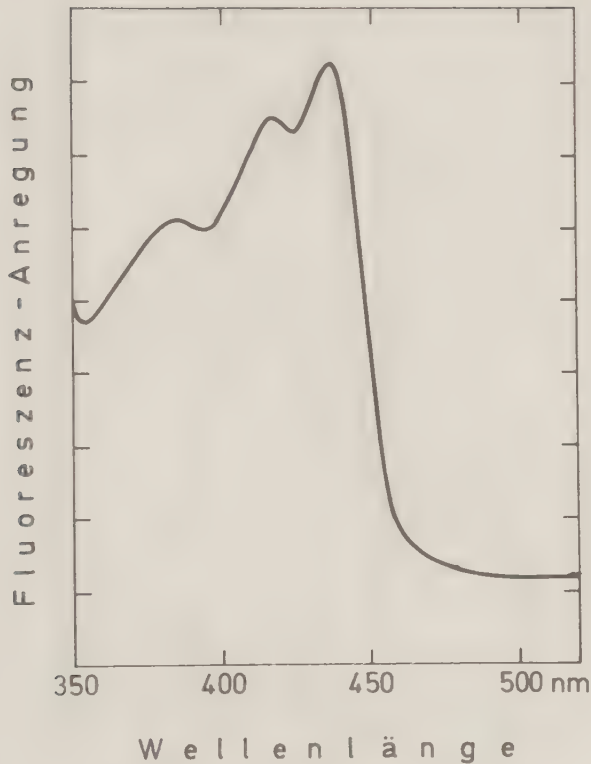


Abb. 26 b: Fluoreszenzanregungsspektrum bei Raumtemperatur der Fraktion IIx einer Dichtegradientenzentrifugation von Digitonin-behandelten Chloroplastenpartikeln, erhalten aus einer Dunkelkultur der Scenedesmus-Mutante C-6D. Das Spektrum wurde in einem automatisch auf quantengleiches Licht korrigierenden Shimadzu RF-502 Fluorimeter gemessen. Die Messung der Emission erfolgte bei 680 nm.

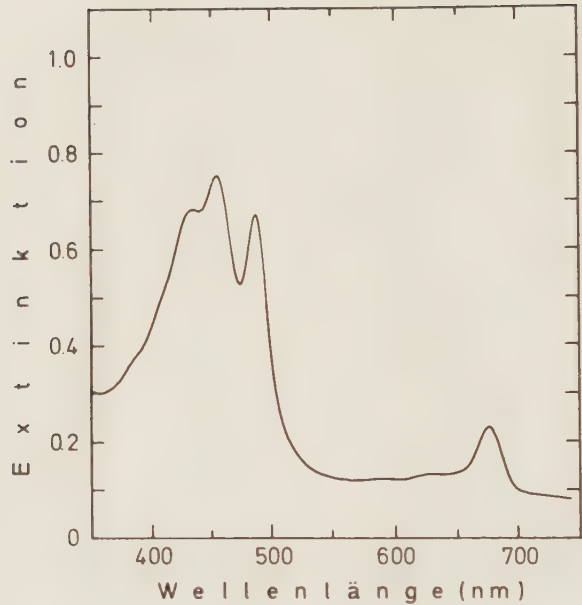


Abb. 27 a: Absorptionsspektrum der Fraktion I einer Dichtegradientenzentrifugation von Digitonin-behandelten Chloroplastenpartikeln, erhalten aus einer für 48 Stunden in Weißlicht von 15 000 Lux bei 30° C ergrüntem Kultur der Scenedesmus-Mutante C-6D. Das Absorptionsspektrum wurde in einem Shimadzu MPS-5000 Spektralphotometer aufgenommen.



Abb. 27b: Fluoreszenzspektrum bei Raumtemperatur (——) und bei Tieftemperatur (-196°C) (-----) der Fraktion I einer Dichtegradientenzentrifugation von Digitonin-behandelten Chloroplastenpartikeln, erhalten aus einer für 48 Stunden in Weißlicht von 15000 Lux bei 30°C ergrüntem Kultur der Scenedesmus Mutante C-6D. Das Spektrum wurde in einem automatisch auf quantengleiches Licht korrigierenden Shimadzu RF-502 Fluorimeter gemessen. Die Messung der Emission erfolgte bei 685 nm.

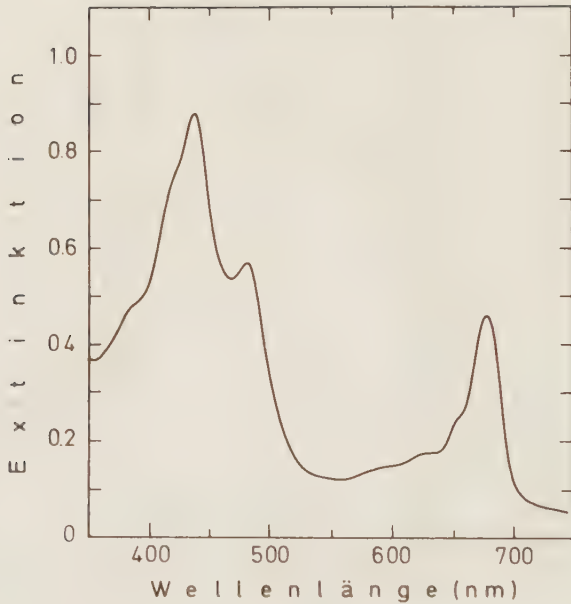


Abb. 28a: Absorptionsspektrum bei Raumtemperatur der Fraktion II einer Dichtegradientenzentrifugation von Digitonin-behandelten Chloroplastenpartikeln, erhalten aus einer für 48 Stunden in Weißlicht von 15000 Lux bei 30°C ergrüntem Kultur der Scenedesmus Mutante C-6D. Das Absorptionsspektrum wurde in einem Shimadzu MPS-5000 Spektralphotometer aufgenommen.

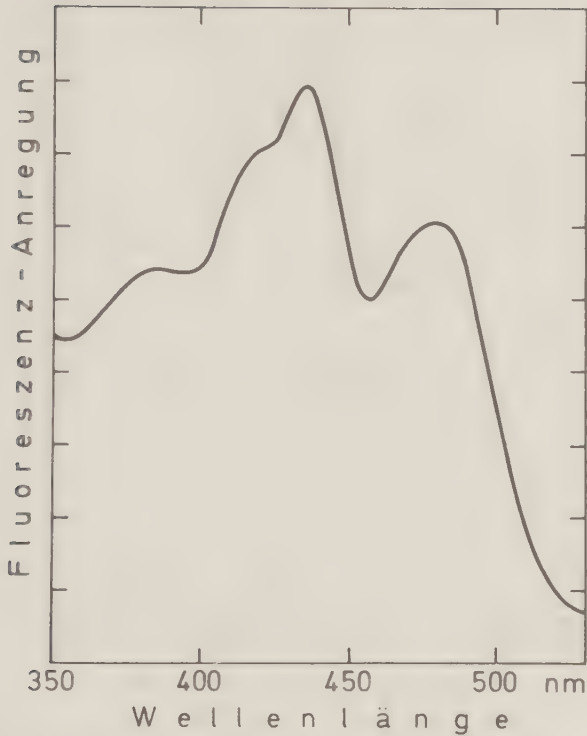


Abb. 28b: Fluoreszenzanregungsspektrum bei Raumtemperatur der Fraktion II einer Dichtegradientenzentrifugation von Digitonin-behandelten Chloroplastenpartikeln, erhalten aus einer für 48 Stunden in Weißlicht von 15000 Lux bei 30°C ergrünt Kultur der Scenedesmus Mutante C-6D. Das Spektrum wurde in einem automatisch auf quantengleiches Licht korrigierenden Shimadzu RF-502 Fluorimeter gemessen. Die Messung der Emission erfolgte bei 685 nm.

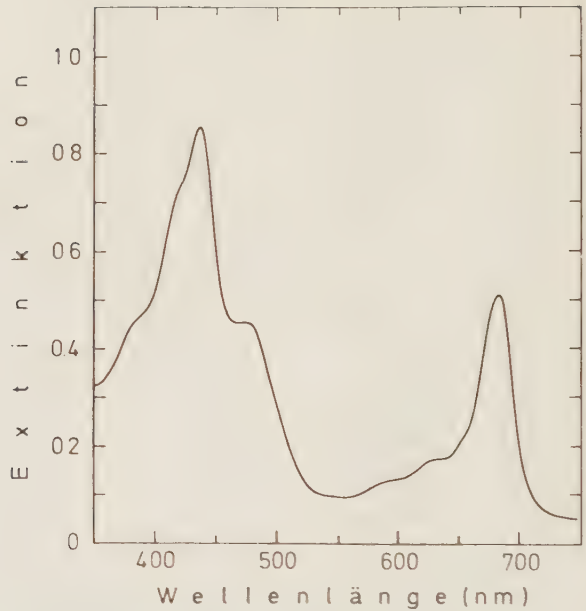


Abb. 29a: Absorptionsspektrum bei Raumtemperatur der Fraktion III einer Dichtegradientenzentrifugation von Digitonin-behandelten Chloroplastenpartikeln, erhalten aus einer für 48 Stunden in Weißlicht von 15 000 Lux bei 30°C ergrünt Kultur der *Scenedesmus* Mutante C-6D. Das Spektrum wurde in einem Shimadzu MPS-5000 Spektralphotometer aufgenommen.

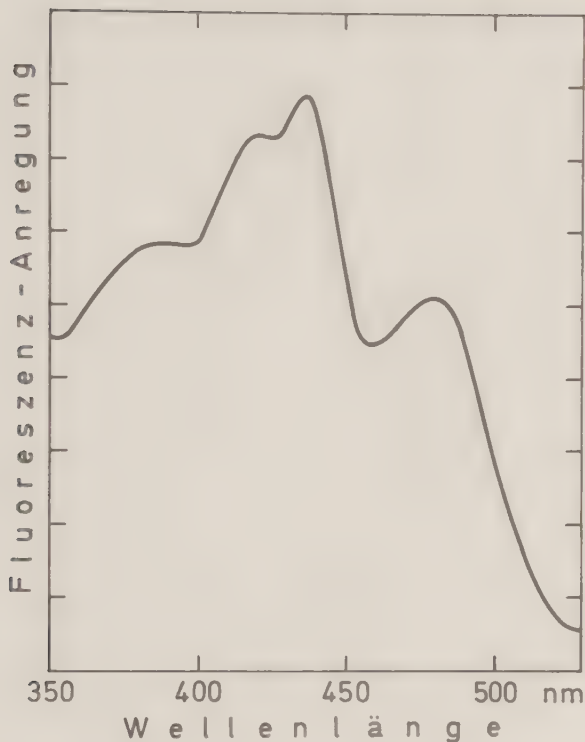


Abb.29b: Fluoreszenzanregungsspektrum bei Raumtemperatur der Fraktion III einer Dichtegradientenzentrifugation von Digitonin-behandelten Chloroplastenpartikeln, erhalten aus einer für 48 Stunden in Weißlicht von 15000 Lux bei 30°C ergrüntem Kultur der Scenedesmus Mutante C-6D. Das Spektrum wurde in einem automatisch auf quantengleiches Licht korrigierenden Shimadzu RF-502 Fluorimeter gemessen. Die Messung der Emission erfolgte bei 685 nm.

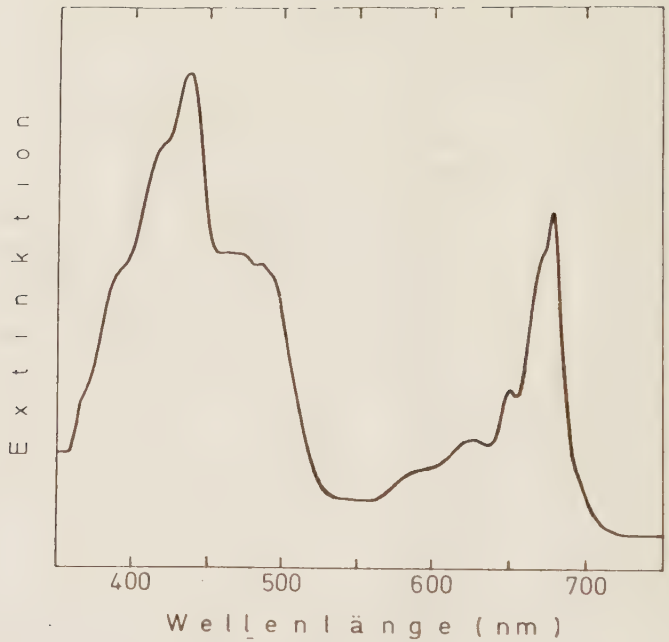


Abb. 30a: Absorptionsspektrum bei Raumtemperatur der Fraktion IV einer Dichtegradientenzentrifugation von Digitonin-behandelten Chloroplastenpartikeln, erhalten aus einer für 48 Stunden in Weißlicht von 15 000 Lux bei 30°C ergrüntem Kultur der *Scenedesmus* Mutante C-6D.

Das Spektrum wurde in einem Shimadzu MPS-5000 Spektralphotometer aufgenommen.

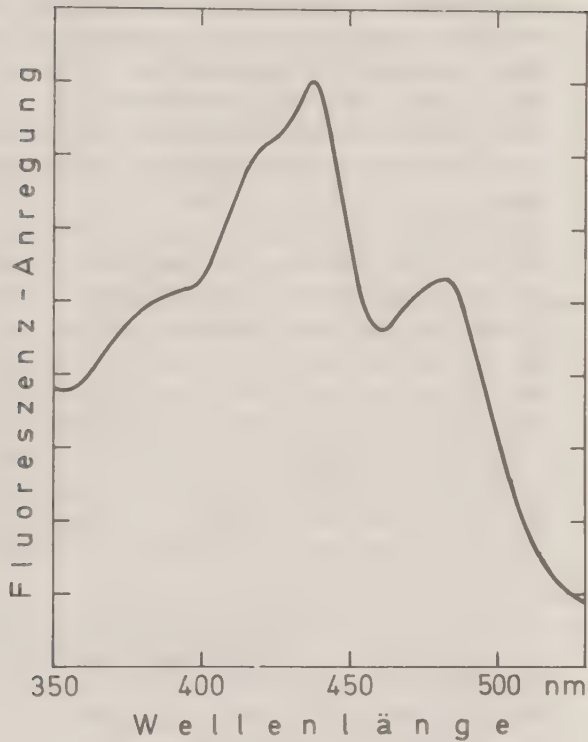


Abb.30b:Fluoreszenzanregungsspektrum bei Raumtemperatur der Fraktion IV einer Dichtegradientenzentrifugation von Digitonin-behandelten Chloroplastenpartikeln, erhalten aus einer für 48 Stunden in Weißlicht von 15000 Lux bei 30°C ergrüntem Kultur der Scenedesmus Mutante C-6D.
Das Spektrum wurde in einem automatisch auf quantengleiches Licht korrigierenden Shimadzu RF-502 Fluorimeter gemessen.
Die Messung der Emission erfolgte bei 685 nm.

Dominierendes Pigment ist in der Fraktion I eindeutig das ζ -Carotin (s. auch Tabelle 4). Das Fluoreszenzanregungsspektrum (Abb. 25 b) ist ein reines Chlorophyll a-Spektrum, d.h. in Fraktion I befindet sich kein Pigment, das absorbierte Energie auf Chlorophyll a übertragen kann.

Fraktion II_x, die grüne Bande der Dichtegradientenzentrifugation von Digitonin-behandelten Partikeln der Dunkelkultur zeigt ein fast reines Chlorophyll a-Absorptionsspektrum (Abb. 26 a). Nur zwei schwach ausgeprägte Schultern bei 475 und 510 nm deuten an, daß sich in dieser Fraktion auch Carotine befinden. Hauptpigment dieser Fraktion ist Chlorophyll a, dessen Absorptionsmaximum im langwelligen Bereich des Spektrums bei 674 nm liegt und somit im Vergleich zu Fraktion I um 2 nm höheren Wellenlängen verschoben ist (vgl. auch Tabelle 4).

Das Fluoreszenzanregungsspektrum dieser Fraktion (II_x) (Abb. 26 b) zeigt ebenfalls eine reine Chlorophyll a-Charakteristik. Auch in dieser Fraktion kann kein Pigment seine Anregungsenergie auf Chlorophyll a übertragen.

Im Vergleich zur Dunkelkultur zeigt Fraktion I der völlig ergrüntten Kultur ein stark abweichendes Spektrum (Abb. 27 a), in welchem jedoch auch Carotinoide dominieren.

Die Absorptionsmaxima im Blaubereich des Spektrums liegen bei 432, 454 und 487. Chlorophyll ist nur in geringen Mengen vorhanden, was aus dem kleinen Chlorophyll-Absorptionspeak bei 674 abgeleitet werden kann.

Im Fluoreszenzanregungsspektrum (Abb. 27 b bei Raumtemperatur) sind zwei deutliche Maxima (bei Wellenlängen oberhalb 450 nm (472 und 494 nm) zu sehen, die als eindeutiger Beweis für die Ener-

gieübertragung von anderen Pigmenten auf Chlorophyll a angesehen werden können. Bei der Temperatur von flüssigem Stickstoff gemessen, wird das Spektrum noch besser aufgelöst, liefert jedoch keine zusätzliche Information. Die beteiligten Pigmente sind Carotinoide und wahrscheinlich Chlorophyll b. GOEDHEER (1969) konnte an der Chlorophyll b-freien Grünalge Tribonema equale zeigen, daß eine Energieübertragung von β -Carotin auf Chlorophyll a möglich ist. Die Maxima der Fluoreszenzanregung bei Raumtemperatur durch β -Carotin liegen in der von GOEDHEER (1969) untersuchten Alge bei 470 und 495 nm. Energieübertragung von Chlorophyll b auf Chlorophyll a ist mit einem Maximum bei 472 verbunden. Da Fraktion I Carotinoide in großen Mengen unspezifisch angereichert enthält, ist es nicht möglich, die beiden Anregungsmaxima oberhalb 450 nm bestimmten Pigmenten zuzuordnen. Mit großer Wahrscheinlichkeit ist jedoch Chlorophyll b am Maximum bei 472 nm beteiligt, während das Maximum bei 494 nm eindeutig durch Übertragung der von Carotinoiden absorbierten Energie auf Chlorophyll a hervorgerufen wird. Ob jedoch nur einige wenige oder alle Carotinoide Anregungsenergie übertragen können, kann hier nicht entschieden werden. Wie aus Arbeiten von KOREN und EPEL (1976) hervorgeht, ist die Energieübertragung von Carotinoiden auf Chl a in den von ihnen untersuchten Mutanten von Chlamydomonas reinhardtii nur bei Anwesenheit von Chlorophyll b möglich. GOEDHEER (1969) fand an ergrünenden Bohnenblättern ebenfalls erst eine Energieübertragung von Carotinoiden, nachdem Chlorophyll b synthetisiert worden ist. Da parallel dazu die Synthese von β -Carotin eingesetzt hatte, könnte jedoch auch der Schluß gezogen werden, daß die vorher schon vorhandenen Xanthophylle

keine Energie auf Chlorophylle übertragen können.

Fraktion II Abb. 28 a ist im Absorptionsspektrum stark durch Chlorophyll a und b geprägt. Die Absorptionsmaxima im kurzwelligen Bereich des Spektrums bei 438 nm und bei 483 nm beruhen auf der Absorption von Chlorophyll a und b, obwohl an der Absorption bei 483 nm auch Carotinoide beteiligt sein werden. Chlorophyll b absorbiert in vivo unterhalb 480 nm (GOEDHEER, 1969, DEROCHÉ und BRIANTAIS, 1974).

Das Rotmaximum bei 674 weist durch die vorhandene Schulter bei 650 nm auf einen hohen Chlorophyll b-Gehalt in dieser Fraktion hin.

Die Fluoreszenzanregung bei 480 nm, die im Fluoreszenzanregungsspektrum (Abb. 28 b) zu sehen ist, beruht aus oben genannten Grünen wahrscheinlich ebenfalls auf der gemeinsamen Wirkung von Carotinoiden und Chlorophyll b.

Als wesentlicher Unterschied zwischen Fraktion III (Abb. 29 a) und Fraktion II ist der hohe Chlorophyll a-Gehalt zu nennen. Der hohe Chlorophyll a-Anteil in der Fraktion III sowohl im Verhältnis zu vorhandenen Carotinoiden, angezeigt durch die niedrige Schulter bei 475-480 nm, als auch zu Chlorophyll b, angezeigt durch die sehr schwach ausgeprägte Schulter im Rotbereich des Spektrums bei 650 nm. Im Unterschied zu Fraktion II dominieren unter den Chlorophyll a-Formen längerwellig absorbierende Spezies. Das Absorptionsmaximum im Rotbereich des Spektrums liegt bei 679 nm. Auch im Fluoreszenzanregungsspektrum ist der Bereich oberhalb 450 nm nicht so ausgeprägt wie im entsprechenden Spektrum der Fraktion II.

Fraktion IV (Abb. 30 a) ist überwiegend durch Chlorophyll a und b geprägt. Hervorzuheben ist

der relativ hohe Chlorophyll b-Anteil, der zu einer ausgeprägten Schulter bei 650 nm führt. Auch in dieser Fraktion befinden sich überwiegend langwellig absorbierende Chlorophyll a-Formen; das Rotmaximum liegt bei 679 nm. Im Fluoreszenzanregungsspektrum liegt das Maximum der oberhalb 450 nm wirkenden Pigmente bei 480 nm, was wiederum sowohl auf Chlorophyll als auch auf die Wirkung von Carotinoiden zurückzuführen ist.

3.2.4.6. Folgerungen aus der Auftrennung der Chloroplasten-Subpartikel

Die Untersuchung der Entwicklung von Photosynthesekapazität und Photosynthese-Teilreaktionen haben ergeben, daß in der Scenedesmus-Mutante C-6D während der ersten Ergrünungsstunden eine Aktivierung von PS II-Zentren stattfindet, während PS I bereits eine sehr hohe Aktivität besitzt. Der Entwicklung und Aktivierung der PS II-Zentren folgt etwa ab der ersten Ergrünungsstunde eine Vermehrung der Antennenpigmente wahrscheinlich beider Photosysteme.

Mit der Entwicklung von PS II ist das Auftreten neuer zusätzlicher Banden in Dichtegradienten von Digitonin-behandelten Chloroplastenpartikeln verbunden. Nach GOVINDJEE(1974) und BROWN (1973) gibt es eine Vielzahl von Befunden, die zu dem Schluß leiten, daß Stromathylakoide nur PS I-Aktivität aufweisen. Im Widerspruch dazu stehen jedoch Befunde (z.B. HALL et al., 1972; SENGER et al., 1974), welche in Stromathylakoiden auch PS II-Aktivität feststellen. Eine effektive Kopplung zwischen beiden Photosystemen wurde jedoch von SENGER et al. (1974) an der Scenedesmus-Mutante C-2A' erst mit dem Auftreten von Grana-Thylakoiden bzw. dem Einsetzen des "Membrane-

Stacking" gemessen. GOVINDJEE kommt daher zu dem Schluß, daß bei der Chloroplastenpartikelpräparation und -trennung nicht reine PS II und PS I Fraktionen vorliegen, sondern daß Fraktionen, die PS I alleine enthalten, weitgehend Stroma-Lamellen entstammen und die PS II-Fraktionen Grana-Fraktionen mit sowohl PS II als auch PS I-Aktivität darstellen. Im folgenden Teil sollen diese "PS II-Fraktionen" als Indiz für die Entwicklung von PS II-Aktivitäten und -Strukturen dienen und insbesondere die spezifisch schwere Bande IV als Zeichen für das Vorhandensein von Grana- oder "Stacked"-Thylakoiden angesehen werden.

3.3. Photosynthesereaktionen und Struktur nach Hemmung der Zyklisierungsreaktion der Carotinoide mit Nicotin

3.3.1. Nicotin als Zyklisierungshemmstoff

In den vergangenen Jahren hat sich das Tabak-Alkaloid Nicotin als effektiver Hemmstoff der Zyklisierungsreaktion von Carotinoiden erwiesen. BATRA et al. (1973) fanden in Mycobacterium maximum eine vollständige Inhibierung der Zyklisierungsreaktion, was dazu führte, daß Lycopin in fast der gleichen Rate akkumulierte, in der sonst β -Carotin vorhanden war. Unter Nicotineinfluß war kein β -Carotin nachweisbar. Auch das monozyklische γ -Carotin fehlte vollständig.

KLEINIG und REICHENBACH (1973) fanden ebenfalls eine Hemmung der Carotinoid-Zyklisierung in Myxococcus fulvus.

HOWES (1974) fand, daß Nicotin einen deutlichen Effekt auf die Zyklisierungsreaktion in Cucurbita ficifolia Cotyledonen ausübt. Die Hemmung war

jedoch nur unvollständig und mit einer Reduktion des Chlorophyllgehaltes der Blätter verbunden.

Untersuchungen an Algen, bei denen die Zyklisierungsreaktion der Carotinoide durch Nicotin gehemmt wurde, liegen meines Wissens bisher noch nicht vor.

Sollte die Zyklisierungsreaktion in der untersuchten Mutante durch Nicotin ebenfalls gehemmt werden, so würde dies ermöglichen, Rückschlüsse auf die Funktion azyklischer und zyklischer Carotinoide zu ziehen. Wegen des Fehlens derartiger Untersuchungen an Algen wurde in einer Konzentrationsreihe die generelle Wirkung des Nicotins auf verschiedene Stoffwechsel- und Wachstumsparameter der *Scenedesmus*-Mutante C-6D untersucht.

3.3.2. Auswirkung verschiedener Nicotin-Konzentrationen auf Wachstumsparameter, Reaktionen und Pigmentsynthese der *Scenedesmus*-Mutante C-6D.

3.3.2.1. Wachstumsparameter und Reaktionen

Um die Auswirkungen der Anwendung von Nicotin auf Stoffwechselfunktionen der Algen und den möglichen Wirkungsort ermitteln zu können bzw Nebenwirkungen zu erfassen, wurden die Wachstumsparameter PCV und Zellzahl, die Atmung sowie die photosynthetische Sauerstoffentwicklung und die Pigmentsynthese der Algen unter verschiedenen Nicotinkonzentrationen bei unterschiedlichen Kulturbedingungen ermittelt.

Tabelle 5 a zeigt im Vergleich, in welcher Weise sich die unterschiedlichen Nicotinkonzentrationen auf die Entwicklung der Algenkultur in Dunkelheit und bei Belichtung auswirken. Zum Vergleich sind die Werte der Ausgangskultur (entspricht einer

Tab. 5a

Probe Wachs- parameter Reaktionen	Dunkel	36 h Belichtung				Dunkel
	Ausgangs- Kultur Dunkelkultur	I Kontrolle (-Nicotin)	II $10^{-2}M$ Nicotin	IIIa $10^{-3}M$ Nicotin	IV $10^{-4}M$ Nicotin	IIb $10^{-3}M$ Nicotin Dunkelk
PCV $\mu l/ml$	10,1	15,67	10,47	11,2	13,5	(9,2) 10,0
Zellzahl $\times 10^7$	4,4	7,95	5,13	5,2	7,6	(3,98) 6,6
Atmung (rel./PCV)	10,0	7,5	-	5,8	8,3	(11) 11
Photosynthese (rel./PCV)	-	47,9	-	0,67	9,8	(0) 0
Rekonstitution	entfällt	entfällt	möglich	möglich	entfällt	ent- fällt

Tab. 5b

Pigment in $\mu g/ml$ PCV

ζ -Carotin	156	17,9	6,8	9,1	15
cis-Neurosporin	36,7	-	-	-	-
all-trans-Neurosporin	20	6,4	10,6	11,3	8,5
cis-Lycopine	54,5	-	-	-	-
all-trans-Lyc.	2	6,2	44,3	58,6	15
Lyc. ges.	56,5	6,2	44,5	58,6	15
γ -Carotin	-	2	-	2,3	2,4
β -Carotin	-	88,5	3,7	6,5	61
α -Carotin	-	Spuren	-	-	Spuren
Lutein-Zea- xanthin	-	74	-	-	140,2
Antheraxanthin	-	24	-	-	25,2
Violax.+Lorox.	-	241	-	-	134
Neoxanthin	-	80	-	-	83
Carotine	268,2	121	65,4	87,8	101,9
Zykl. Car. gesamt	-	507,5	3,7	6,5	443,4
Xanthophylle	-	419	-	-	382,4
Car. + X.	268,2	540	65,4	87,8	484,3
Chlorophyll a	274	340	-	22,5	1158
Chlorophyll b	-	276	-	Spuren	273
Chlorophyll a/b	-	4,86	-	-	4,25
Chlorophyll ges.	-	-	-	-	-
Carotinoide ges.	1,02	2,992	-	0,256	2,96

Kein Effekt auf die Pigment-
zusammensetzung in Dunkelheit
(vergl. Tab. 6, S. 125)

Tab.5: Einfluß verschiedener Nicotin-Konzentrationen

a u.b

(angegeben sind die Endkonzentrationen im Nährmedium) auf Wachstumsparameter, Reaktion (a) und Pigmentzusammensetzung (b) von 36 Stunden belichteten Kulturen der Scenedesmus Mutante C-6D.
(Fortsetzung nächste Seite)

Die Belichtung erfolgte mit Weißlicht von 15000 Lux bei 30°C.

Nicotin wurde aus einer sterilen Stamm-lösung von Nicotin-Base "reinst" (Serva Nr. 30307), die auf pH 7,3 eingestellt wurde, den Algenkulturen in entsprechender Konzentration zugegeben.

Tab. 5a, letzte Spalte:

Werte in Klammern stellen die jeweiligen Parameter der Kultur unmittelbar vor Nicotin-zugabe dar. Die Kultur befand sich in der log. Wachstumsphase. Die jeweils darunter befindlichen Werte wurden 24 h später gemessen.

	I ohne Nic. Kontrolle	II 10^{-2} Nicotin	III 10^{-3} M Nicotin	IV 10^{-4} M Nicotin
<u>Chl. ges.</u> Carotinoide	2,99	65,4	0,256	2,95
<u>Chl. ges.</u> Lycopin ges.	260,6	$\overline{44,3}$	0,384	95,4
<u>Chl. ges.</u> β -Car.	18,3	$\overline{3,7}$	3,46	23,46
<u>Chl. ges.</u> Zykl. Carotinoide ges.	3,18	$\overline{3,7}$	3,46	3,23

Tab. 5c: Verhältnis von Gesamtchlorophyll zu verschiedenen Carotinoidgruppen, basierend auf den Werten von Tab. 5b, S.116.

3 Tage alten Dunkelkultur), die Werte einer Dunkelkontrolle, der 10^{-3} M Nicotin (Endkonzentration) zugegeben wurde, sowie einer weiteren Kontrolle, die ohne Nicotinzusatz unter sonst gleichen Bedingungen parallel ergrünte, darstellt.

Als Dunkelkontrolle mit 10^{-3} M Nicotinzugabe wurde eine Kultur gewählt, die sich noch in der logarithmischen Wachstumsphase befand. Eine Kultur, die sich in der stationären Wachstumsphase befindet, ist ungeeignet, weil sich in ihr die Wachstumsparameter nur noch geringfügig ändern. Wenn Nicotin generell einen Einfluß auf das Wachstum der Algen ausübt, muß dieser Einfluß an der Dunkelkultur, die sich noch in der Entwicklung befindet, sichtbar werden.

Vorab kann aus der Entwicklung der mit Nicotin versetzten Dunkelkultur III b abgeleitet werden, daß Nicotin bei Dunkelheit keinen feststellbaren Einfluß auf die Teilungsfähigkeit und auf die Zunahme der Gesamtmasse der Algen(PCV)ausübt. Wie an anderer Stelle noch gezeigt wird (s.Tabelle 6), entwickeln sich auch die Pigmente bei Dunkelwachstum unter Nicotin normal. Alle aus Tabelle 5a ablesbaren schädigenden Einflüsse des Nicotins beruhen auf der gemeinsamen Wirkung von Nicotin und Licht.

Der entwicklungshemmende Einfluß von Nicotin bei Licht ist konzentrationsabhängig. Am stärksten schädigend wirkt die höchste Konzentration von 10^{-2} Nicotin. 10^{-4} M Nicotin (Kultur IV) hat nur noch eine relativ geringe Wirkung auf die Entwicklung des PCV und der Zellzahlen.

In der Tabelle nicht dargestellte, jedoch gemessene Daten von Kulturen, die unter 10^{-5} M und 10^{-6} M Nicotin ergrünten, zeigten in der Zunahme von PCV und Zellzahlen keinen negativen Effekt mehr.

Ein Vergleich der gemessenen Reaktionen der Kulturen, welche als Indikatoren für typische Stoffwechselleistungen angesehen werden, zeigt auch hier die starke Konzentrationsabhängigkeit der Schädigung. Nicotin in der Konzentration 10^{-2} M führt zu einer völligen Inaktivierung von Atmung und Photosynthese. Die unter 10^{-3} M Nicotin bei Belichtung gewachsene Kultur zeigt eine schwache Atmung und eine sehr geringe Photosynthese. Unter 10^{-4} M Nicotin liegt die Atmung höher als bei der belichteten Kontrolle. Da während der Ergrünung ohne Hemmstoffzugabe die Atmung erst ansteigt und nach Durchlaufen eines Maximums zur 3. - 5. Stunde (s. Abb. 20) wieder abfällt, kann die höhere Atmung in der Kultur IV als Indiz für eine Entwicklungsverzögerung angesehen werden.

Daß sowohl Kultur III als insbesondere auch Kultur II bei dem Experiment nicht letal geschädigt wurden, zeigte ein Rekonstitutionsversuch, bei dem die Algen beider Kulturen abzentrifugiert, mit Pufferlösung 1 x gewaschen und anschließend in frisches Nährmedium überführt wurden. Kultur III begann nach 24 Stunden und Kultur II nach 48 Stunden deutlich zu ergrünen, was als eindeutiges Indiz der Vitalität der Kulturen angesehen werden kann.

3.3.2.2. Pigmente

3.3.2.2.1. Abhängigkeit der Pigmentzusammensetzung von der Nicotinkonzentration

Wie Tabelle 5 b zeigt, kommt es unter dem Einfluß von Nicotin und Licht zu starken Veränderungen im Pigment-Muster der Kulturen.

So sind in den belichteten Kulturen keine der in Dunkelheit akkumulierten cis-Carotin-Vorstufen mehr vorhanden. Weiter ist festzustellen, daß die Menge der Carotine, die in den Kulturen vorliegen, von der Nicotinkonzentration abhängt. Kultur II mit der höchsten Nicotinkonzentration enthält die geringste Menge Carotine. Mit geringerer Nicotinkonzentration (Kultur III a und IV) nimmt der Carotinoidgehalt der Kulturen zu. In Kultur IV liegt keine erhebliche Abweichung von der belichteten Kontrolle mehr vor. Parallel zum Carotinoidgehalt der Kulturen verläuft der Chlorophyllgehalt. In Kultur II mit dem geringsten Carotinoidgehalt liegen nur noch Spuren von Chlorophyll a vor. Kultur III a zeigt sowohl Chlorophyll a, als auch Chlorophyll b. Chlorophyll a ist jedoch bezogen auf die Ausgangskultur "0" nur in ca. 10% der ursprünglichen Menge vorhanden. In Kultur IV liegt Chlorophyll b relativ zu Chlorophyll a angereichert vor, was ein Vergleich der Verhältnisse Chlorophyll a/b der Kontrolle I und Kultur IV zeigt. Wie Tabelle 5 b weiter zeigt, beruht die Wirkung des Nicotins auf die Pigmentzusammensetzung in einer Hemmung der Zyklisierung der Carotinoid-Vorstufen. In allen Nicotin-behandelten Kulturen kommt es zu einer Akkumulierung von Lycopin. Dabei ist der Neurosporin-Gehalt der Nicotin-Kulturen ebenfalls geringfügig höher im Vergleich zur Kontrolle. Bei Konzentrationen von 10^{-2} und 10^{-3} M ist die Hemmung fast vollständig, so daß nur noch sehr geringe β -Carotin-Mengen und keine Xanthophylle zu finden sind. In der Kultur IV sind die Relationen sowohl der Carotine, als auch der Xanthophylle im Vergleich zur Dunkelkultur verschoben, die hemmende Wirkung auf die Zyklisierungsreaktion ist jedoch nur gering.

In Abb. 31 sind die Absorptionsspektren der methanolischen Rohextrakte der Ausgangskultur, (O.h) der Kultur III und der Kontrolle (Kultur I) dargestellt. Die Spektren zeigen jeweils die Charakteristik der Hauptpigmente der entsprechenden Kultur. Das Absorptionsspektrum der Dunkelkultur ist geprägt durch die β -Carotin-Maxima bei den Wellenlängen von 382 nm, 403 nm und 428 nm und Schultern, die der Absorption von cis-Lycopin und all-trans-Lycopin bei 465-470 nm, 500-505 nm zuzuordnen sind.

Das Spektrum der Kontrolle ist geprägt durch die Chlorophyll a-Absorption bei 436 nm und 664 nm und das Chlorophyll b-Maximum bei 470 nm. Die Rotabsorption von Chlorophyll b geht im Chlorophyll a-Peak völlig auf.

Die unter 10^{-3} M Nicotin ergrünte Kultur zeigt ein völlig durch all-trans-Lycopin geprägtes Absorptionsspektrum mit den Maxima bei 445 nm, 472 nm und 503 nm. Chlorophyll a und b sind nur noch in Spuren vorhanden, was die sehr schwache Chlorophyll-Absorption im langwelligen Bereich des Spektrums zeigt.

An dieser Stelle ergibt sich nun die Frage, welches die Ursachen für die geringen Chlorophyllmengen und die ebenfalls festzustellende Abnahme der Carotinoide, bezogen auf die Dunkel-Kultur sein können.

3.3.2.2.2. Nachweis der Photooxidation des Chlorophylls

Als mögliche Ursachen für die geringen Chlorophyllmengen in den Nicotin-behandelten Kulturen kommen dabei in Frage:

1. Hemmung der Chlorophyllsynthese durch Nicotin bei gleichzeitiger Ausdünnung des vorhandenen

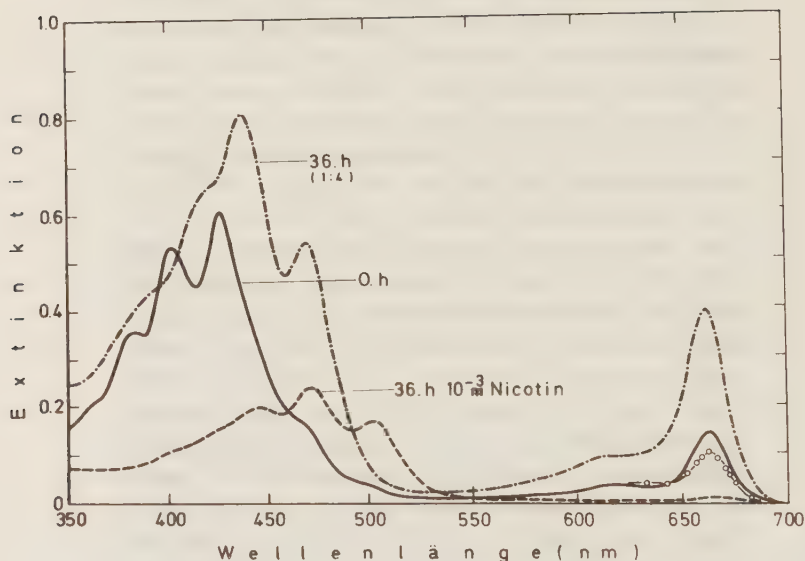


Abb. 31: Absorptionsspektren methanolischer Rohextrakte verschiedener Kulturen der Mutante C-6D von Scenedesmus.

Abgebildet sind:

———— 0.h. = Ausgangskultur

- - - - - 36.h =

..... 36 h unter 10⁻³ Nicotin gewachsen.

o-o-o-o- Kurve ----- 10-fach verstärkt.

Die Belichtung der beiden 36.h-Kulturen erfolgte mit Weißlicht von 15 000 Lux bei 30°C. Die Spektren wurden mit einem Shimadzu MPS-5000 Zweistrahlsspektrophotometer aufgenommen.

Chlorophylls im Verlaufe der Weiterentwicklung der Kultur.

2. Photooxydativer Abbau des Chlorophylls aufgrund ungenügenden Oxydationsschutzes durch die Carotinoide.

Alternative 1 (Hemmung der Chlorophyllsynthese unter Ausdünnung der Chlorophylle) scheidet aus, da unter den gegebenen Bedingungen (s. Tabelle 5a) nur ein sehr geringes Wachstum der Kultur stattfindet. Das PCV, der Parameter, auf den die jeweiligen Pigmentmengen bezogen sind, bleibt nahezu konstant, so daß die Chlorophyllabnahme nicht auf einem Ausdünnungseffekt beruhen kann.

Damit ist es sehr wahrscheinlich, daß in den Nicotin-behandelten Kulturen eine photooxydative Zerstörung der Chlorophylle stattfindet.

Die Chlorophyllsynthese selbst dürfte durch das vorhandene Nicotin nicht beeinflußt werden. Eine 3 Tage bei Dunkelheit unter 10^{-3} M gewachsene Kultur zeigte keine Änderung in der Pigmentzusammensetzung verglichen mit einer Kontrolle ohne Nicotin (s. Tab. 6). Würde Nicotin in die Chlorophyllsynthese eingreifen, so müßte die unter Nicotin gewachsene Dunkelkultur eine Veränderung im Chlorophyllgehalt zeigen.

Auch die Chlorophyll b-Synthese kann nicht direkt durch Nicotin-Wirkung gehemmt sein. Sonst dürfte das Chlorophyll b unter 10^{-4} M Nicotin (Tabelle 5b, Kultur IV nicht, verglichen mit der Kontrolle, in größerer Rate vorliegen.

Um zu prüfen, ob die Pigmente tatsächlich durch Photooxydation zerstört werden, obgleich mit Lycopin, einem Carotin mit 11 konjugierten Doppelbindungen, ein Carotinoid in den Algen vorhanden ist, welches einen Schutz vor Photooxydationen gewährleisten müßte, wurde folgendes Experiment durchgeführt:

Drei aus einer gemeinsamen Stammkultur entnommenen Kulturen wurden wie folgt behandelt:

1. Kultur D (D= Dunkelkultur) wurde mit Nicotin versetzt und bei Dunkelheit mit 3% CO₂ in Luft begast.
2. Kultur N/N (N/N= Nicotin unter N₂) wurde nach Nicotinzugabe mit reinem Stickstoff begast und für 24 Stunden belichtet.
3. Kultur N/L (N/L= Nicotin unter Luft) wurde nach Nicotinzugabe mit 3% CO₂ in Luft begast und 24 Stunden belichtet.

In allen drei Fällen betrug die Temperatur 30°C, die Lichtintensität, mit der die Kulturen N/N und N/L bestrahlt wurden, betrug 15 000 Lux, die Nicotinkonzentration der Algensuspension war 10⁻³ M.

Tabelle 6 bestätigt die Annahme, daß eine photooxidative Zerstörung sowohl von Chlorophyllen als auch von Carotinoiden stattfindet. Die typischen Bedingungen, unter denen Photooxidationen stattfinden, sind nur in Kultur N/L gegeben.

Die Bedingungen sind :

1. Belichtung,
2. die Anwesenheit von Sauerstoff
3. das Vorhandensein einer als Sensibilisator fungierenden fluoreszenzfähigen Substanz (Chlorophyll)

Wahrscheinlich werden sowohl Chlorophylle als auch Carotinoide photooxidativ zerstört. Dafür spricht das in allen drei Kulturen vergleichbare Verhältnis von Chlorophyllen zu Carotinoiden. Für Kultur D beträgt das Verhältnis Chlorophylle/Carotine 0,66, für Kultur N/N 0,62 und für Kultur N/L, die nur ca. 1/5 des Pigmentgehaltes der anderen Kulturen aufweist, ist dieses Verhältnis 0,68.

Probe: Pigment µg/ml PCV	Dunkel- kontrolle	Dunkel + 10^{-3} N Nicotin	Licht 10^{-3} Nic. unter N ₂	Licht 10^{-3} a.c. Luft + CO ₂	
Phytofluon	vorhanden	6,2	5,8	5,4	
S-Carotin	155,7	153	164	10,2	
Proneuro- sporin	15,1	51,5	-	-	
cis-Neuro- sporin	21,6	46	-	-	
all-trans- Neurosporin	20	35	58	10,5	
Neurosporin	56,7	132,5	58	10,5	
Prolycopin	17,3	27	-	-	
poly-cis- Lycopin III	22,7	13,8	-	-	
poly-cis- Lycopin	11,3	14,3	-	-	
cis-Lycopin	3,2	4,2	-	-	
all-trans- Lycopin	1,9	Spuren	90	37,4	
Lycopin	56,4	59,3	90	37,4	
β-Carotin	-	-	40	3	
α-Carotin	-	-	2,9	1,4	
Carotine	268,8	351,0	366,7	67,9	
Chl. a	274	230	228	48,9	
Chl. b	-	2,8	0,72	3,7	
Xanthophylle				19 Zeax.	
a/b	∞	82,1	316,7	13,2	

Tab. 6: Einfluß von Nicotin, Licht und Sauerstoff auf den Pigmentabbau in der Scenedesmus Mutante C-6D.

Die Kulturen N/M und N/L wurden mit Weißlicht von 15000 Lux bei 30°C belichtet. Kultur N/D wurde bei 30°C dunkel gehalten. Kultur N/N wurde mit Stickstoff "reinst", Kultur N/L und N/D mit 3% CO₂ in Luft begast. Die Dauer des Experimentes betrug 24 Stunden.

Die bisher dargestellten Experimente, in denen Nicotin als Hemmstoff eingesetzt wurde, zeigen, daß Nicotin in der Konzentration von 10^{-3} M (und höher) als effektiver Zyklisierungshemmstoff wirkt.

In den belichteten Kulturen wird all-trans-Lycopin, ein azyklisches Carotin mit 11 konjugierten Doppelbindungen akkumuliert. Obwohl das Lycopin effektive Schutzwirkung durch dieses Molekül erlauben würde, kommt es zur photooxydativen Zerstörung von Pigmenten. Das Lycopin ist demnach in der Mutante C-6D nicht in der Lage, eine Schutzfunktion auszuüben.

Tabelle 5c zeigt, daß das Verhältnis von Gesamtchlorophyllen zu den verschiedenen Carotinoidgruppen in in den unter verschiedenen Nicotinkonzentrationen gewachsenen Kulturen nur im Falle Chl. ges.
zykl. Car.ges. eine deutliche Konstanz zeigt.

Demnach können in der Mutante C-6D nur die zyklischen Carotinoide in einen Zusammenhang mit dem Schutz der Algen (+Pigmente) vor Photooxydationen gebracht werden. Da die Chlorophyllsynthese durch Nicotin nicht direkt beeinflusst wird, muß die Verringerung des Chlorophyllgehaltes bei abnehmendem Carotinoidgehalt in starkem Maße durch Photooxydation bewirkt werden. Das Ausmaß der photooxydativen Zerstörung des Chlorophylls muß die Rate der Chlorophyllsynthese, die unter den geschilderten Bedingungen noch abläuft, so weit übertreffen, daß die Chlorophyllkonzentration fast ausschließlich durch die Rate der Photooxydation festgelegt wird.

3.3.2.3. Reaktion von Chloroplastenpartikeln

Die Untersuchungen von Photosynthesereaktionen wurden alle an Algen vorgenommen, deren Carotinoid-

synthese mit 10^{-3} M Nicotin gehemmt worden war. Bei dieser Konzentration liegt eine optimale Hemmung der Zyklisierungsreaktion von Lycopin vor, insbesondere im Hinblick auf die Photosyntheseeigenschaften der Algen. Es findet nämlich in den Algen (s. Tabelle 5a; IIIa) noch eine wenn auch äußerst schwache Photosynthese statt. Außerdem werden von den Algen verschiedene Chlorophyllformen gebildet, so daß das Absorptionsspektrum Abb. 32) und das Ableitungsspektrum der Chlorophyllabsorption im langwelligen Bereich des Spektrums weitgehend identisch ist mit dem Spektrum einer ohne Nicotin-Zugabe ergrünenden Kultur der Mutante (s. Abb. 9, Kap. 3.2.2.1.).

In den unter 3% CO_2 in Luft begasten mit 10^{-3} M Nicotin versetzten Algen ist an ganzen Zellen noch eine sehr geringe Photosyntheseaktivität feststellbar. (Tabelle 7)

Probe	Reaktion	Photosynthese	PS I	PS II
		(O_2 -Entw.)	Asc./DCPIP → MeV	$\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{DCPIP}$
a 10^{-3} M Nic. (3% CO_2 /Luft)	Ganze Zellen	sehr schwach		
	Partikel		500,6	- -
b 10^{-3} M Nic. (N_2)	Ganze Zellen	—		
	Partikel		1773, 6	- -

Tabelle 7: Photosynthese/PCV ganzer Zellen und Teilreaktionen von Chloroplastenpartikeln (bezogen auf Chlorophyll). Beide Kulturen enthielten Nicotin in der Endkonzentration 10^{-3} M und wurden mit 15 000 Lux Weißlicht bei 30°C für 24 Stunden belichtet. Kultur a wurde mit 3% CO_2 in Luft, Kultur b mit Stickstoff "reinst" begast.

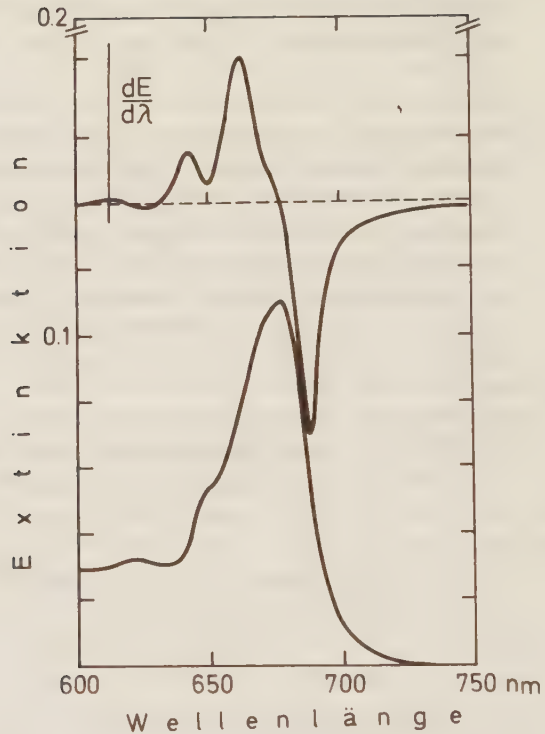


Abb. 32: Absorptionsspektrum im roten Spektralbereich und Ableitungsspektrum (1. Ableitung des Absorptionsspektrums) einer durch 10^{-3} M Nicotin in der Carotinoidbildung gehemmten Kultur der Scenedesmus Mutante C-6D.

Die Anzucht erfolgte über 36 Stunden im Weißlicht von 15000 Lux und 30°C .

Die Begasung erfolgte mit 3% CO_2 in Luft.

Die Spektren wurden im Shimadzu UV-3000 Zweistrahlsspektralphotometer aufgenommen.

Die Bildung der 1. Ableitung erfolgte durch eine Zusatzelektronik.

Diese noch meßbare Photosynthesekapazität deutet Restaktivitäten von beiden Photosystemen an. Chloroplastenpartikel (Tabelle 7) zeigen jedoch gegenüber den ganzen Zellen keinerlei PS II-Aktivität. Die Rest-PS II-Aktivität muß bei der rauen Aufbruchsmethode völlig verlorengegangen sein. PS I ist jedoch in Chloroplastenpartikeln der Nicotin-inhibierten Algen deutlich vorhanden.

Tabelle 7 zeigt außerdem, daß intakte Zellen der unter Stickstoff-Begasung belichteten Algen keinerlei Photosyntheseaktivität zeigen. In den Chloroplastenpartikeln dieser Algen ist jedoch eine hohe PS I-Aktivität vorhanden. PS II ist nicht nachweisbar.

3.3.3. Untersuchungen der Struktur

3.3.3.1. Fraktionen im Saccharose-Gradienten und Reaktionen

Die Auftrennung Digitonin-behandelter Chloroplastenpartikel von Algen, die unter $10^{-3}M$ Nicotin für 24 Stunden belichtet worden waren, ergaben folgendes Bild (Abb. 33 a):

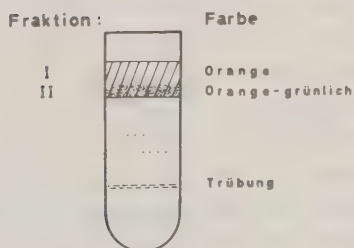


Abb. 33a :
Verteilung von Chloroplasten-Subpartikeln einer durch $10^{-3}M$ Nicotin in der Carotinoid-Synthese gehemmten Kultur der Scenedesmus-Mutante C-6D. Die Subpartikel wurden durch Digitoninbehandlung von Chloroplastenfragmenten erhalten. Konzentration des Gradienten $10 \rightarrow 66\%$.

Verursacht durch das orange-rötliche all-trans-Lycopin, welches in den Algen akkumuliert ist, ist die Bande I im Saccharose-Gradienten rötlich gefärbt. Die sich anschließende Bande II ist sehr schwach grün gefärbt. Außer diesen beiden Banden sind im Gradienten nur noch Trübungszonen auszumachen. Fraktion I und Fraktion II zeigen ausschließlich PS I-Aktivität (s. Tabelle 8).

Fraktion	Blaubereich des Spektrums max					Rotbereich des Spektrums		Reaktionen			
	1	2	3	4	5	1	2	PS I	PS II	±	DPC
I	385	412	435	460	483	(650)	672-4	460	—		
II	388	415	436	-	483	(650)	672-4	57	—		

Tabelle 8: Absorptionsmaxima und Reaktionen der Fraktionen I und II einer Trennung von Digitonin-behandelten Chloroplastenfragmenten im kontinuierlichen Saccharosegradienten.

PS I- Aktivitäten in $\mu\text{Mol red. DCPIP}$
 $\times \text{mg Chl}^{-1} \times \text{h}^{-1}$

Die Partikel wurden aus einer unter 10^{-3} M Nicotin für 24 Stunden bei 15000 Lux und 30°C gewachsenen Algenkultur gewonnen.

Da auch Fraktion I und II trüb sind, lassen sich aufgrund der hohen Streulichteefekte, verursacht durch die Trübung und den sehr geringen Pigmentgehalt der Banden, Absorptionsspektren nur unter Schwierigkeiten bei hohen Verstärkungen aufnehmen. Aus diesem Grund werden die Absorptionsmaxima der Fraktionen in einer Tabelle (8) dargestellt. Fraktion I ist durch Maxima von Carotinoidvorstufen geprägt: So zeigt die Form der Spektren, daß die Maxima 1,2,3 durch β -Carotin hervorgerufen werden. Die Maxima 4 und 5 werden durch all-trans-Lycopin verursacht. Das Maximum im Rotbereich ist auf Chlorophyll a zurückzuführen, die in Klammern angedeutete Schulter bei 650 nm zeigt Chlorophyll b an. Das Absorptionsspektrum von Fraktion II ist stärker vom Chlorophyll a innerhalb der Fraktion geprägt. Die Maxima 1, 2 beruhen auf Absorption von β -Carotin und Chlorophyll a, wobei das Chlorophyll eindeutig dominiert. Die Verschiebung der 3 Maxima zu größeren Wellenlängen unterstreichen diese Dominanz von Chlorophyll a. Maximum 4 wird überwiegend durch Chlorophyll b verursacht. Das Maximum im Rotbereich ähnelt dem Rot-Maximum von Fraktion F I, ist jedoch ausgeprägter. Außerdem ist die durch Chlorophyll b bei 450 nm hervorgerufene Schulter kräftiger ausgeprägt als die Chlorophyll b-Schulter in Fraktion I.

Die Fluoreszenzanregungsspektren von Fraktion I und II sind von Chlorophyll a - und Chlorophyll b - Charakteristika geprägt (Abb. 33b, 33c).

Das Anregungsmaximum bei 436 nm in beiden Spektren stammt vom Chlorophyll a selbst, während die beiden Maxima oberhalb 450 nm wahrscheinlich ausschließlich seine Anregungsenergie auf Chlorophyll a überträgt. Wegen der großen Symmetrie dieses Maximums und seiner Lage bei 475 ist es

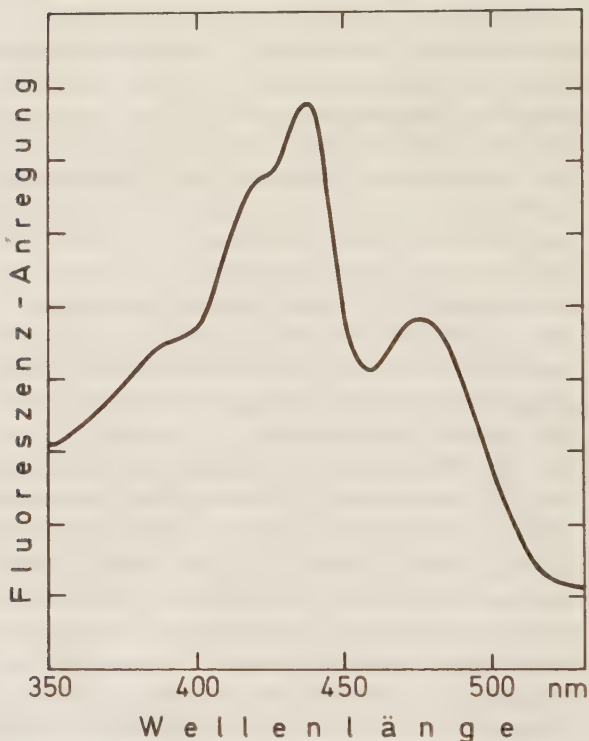


Abb. 33b: Fluoreszenzanregungsspektrum bei Raumtemperatur der Fraktion I einer Dichtegradientenzentrifugation von Digitonin-behandelten Chloroplastenpartikeln, erhalten aus einer 24 Stunden unter 10^{-3} M Nicotin bei 30°C gewachsenen Kultur der Scenedesmus Mutante C-6D.

Das Spektrum wurde in einem automatisch auf quantengleiches Licht korrigierenden Shimadzu RF-502 Fluorimeter gemessen. Die Messung der Emission erfolgte bei 685 nm.

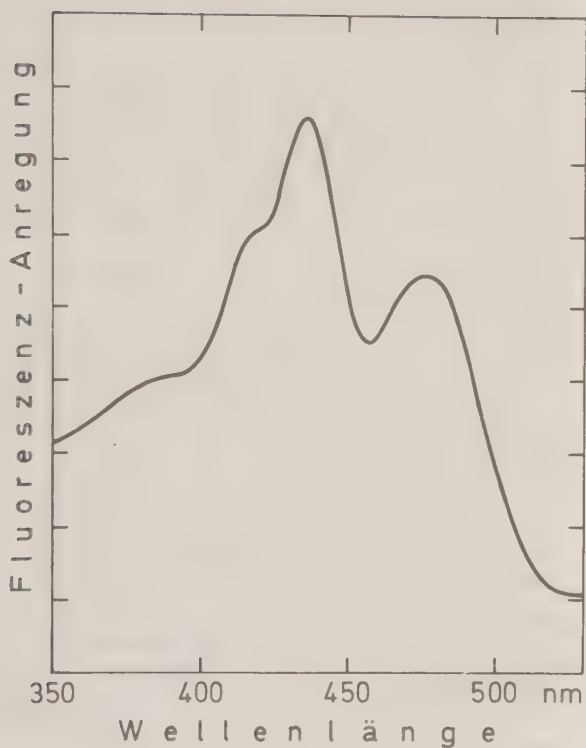


Abb.33c: Fluoreszenzanregungsspektrum bei Raumtemperatur der Fraktion II einer Dichtegradientenzentrifugation von Digitonin-behandelten Chloroplastenpartikeln, erhalten aus einer für 24 Stunden unter 10^{-3} M Nicotin, in Weißlicht von 15000 Lux bei 30°C gewachsenen Kultur der Scenedesmus Mutante C-6D.

Das Spektrum wurde in einem automatisch auf quantengleiches Licht korrigierenden Shimadzu RF-502 Fluorimeter gemessen. Die Messung der Emission erfolgte bei 685 nm.

unwahrscheinlich, daß Carotinoide an seinem Zustandekommen beteiligt sind. Dies zeigt auch ein Vergleich mit den Abbildungen 27-30, in welchen das oberhalb 450 nm auftretende Anregungsmaximum bei 480 nm liegt. Wäre das akkumulierte Lycopin am Energietransfer beteiligt, müßte das Maximum bei größeren Wellenlängen liegen und möglicherweise eine Schulter aufweisen, da Lycopin das in der Mutante C-6D vorkommende Carotinoid mit den längstwelligen Absorptionsmaxima ist.

Zusammenfassend läßt sich aus den Hemmstoffuntersuchungen folgendes ableiten:

Nicotin hemmt in der Scenedesmus-Mutante C-6D sehr effektiv die Zyklisierung der in Dunkelheit in der Mutante akkumulierten azyklischen Carotinoid-Vorstufen. Verbunden mit der Hemmung ist eine stark einschränkende Wirkung auf die Entwicklung des Photosyntheseapparates. Photosystem II und die ihm zuzuordnenden Membranfraktionen im Saccharose-Dichtegradienten sind nicht oder nur in sehr geringen Mengen vorhanden. Der Effekt des Nicotins beruht primär auf der Unterbrechung des Carotinoid-Syntheseweges. Verbunden damit ist die Bildung von PS II stark eingeschränkt oder verhindert.

Für die Wirkung des Nicotins auf PS II über die Hemmung der Carotinoid-Synthese spricht unter anderem die Entwicklungskinetik von PS II bzw. der davon abhängigen Photosynthesekapazität (s. Kap. 3.2.3.1.1.ff und besonders Abb. 8, 13, 23). Ist die Carotinoid-Synthese nicht gehemmt, d.h. ergrünen die Algen unter Abwesenheit von Nicotin, setzt sofort mit Einsetzen des Lichtes eine Aktivierung von PS II ein, obwohl in der ersten Ergrünungsstunde keine Chlorophyllsynthese feststellbar ist. Wäre die PS II-Aktivierung Chlorophyll-abhängig, d.h. würde in der frühen Ergrünungsphase ein vorliegendes Chlorophyll-Derivat

verändert und dadurch PS II in eine reaktive Form gebracht, müßte auch unter Nicotin-Anwesenheit eine Entwicklung der Photosynthesekapazität und damit von PS II stattfinden, weil Nicotin die Chlorophyllsynthese direkt nicht hemmt und das in der Dunkelkultur vorhandene Chlorophyll relativ langsam photooxydativ zerstört wird: Nach 5-stündiger Belichtungsdauer liegt noch ca. 50-60% der Ausgangsmenge vor. Wenn die Wirkung des Nicotins auf seiner Sekundärwirkung beruhen würde, die u.a. darin besteht, daß durch Hemmung der Carotinoidsynthese die zum Schutze des Chlorophylls vor Photooxydation befähigten Carotinoide nicht gebildet werden können und die Chlorophylle daher photooxydativ zerstört werden, müßte es aus oben genannten Gründen zu einer anfänglichen Aktivierung von PS II und somit auch der Photosynthesekapazität kommen. Erst im Verlaufe der andauernden Belichtung müßte - durch Zerstörung des Chlorophylls bedingt - die Photosynthesekapazität absinken. Dies ist jedoch nicht der Fall. Nicht genauer dargestellte Untersuchungen, in denen die Photosynthesekapazität Nicotin-behandelter Algen über den gesamten Belichtungszeitraum gemessen wurde, zeigten in den ersten Belichtungsstunden keinerlei Photosyntheseaktivitäten. Unter Bedingungen, die eine Entwicklung des Photosyntheseapparates ermöglichen, ist der Chlorophyllgehalt der Algen, u.a. auch von der Carotinoidsynthese abhängig. Im Falle der Nicotin-gehemmten Algenkulturen besteht diese Abhängigkeit wahrscheinlich in der mehr oder weniger ausgeprägten Synthese von Carotinoiden, welche die Chlorophylle vor einem photooxydativen Abbau schützen können.

3.4. Photosynthesereaktion und Struktur bei Unterdrückung der Xanthophyllbildung

3.4.1. Wachstum und Reaktion

Nach Untersuchungen, die CIAES (1957, 1958) an der Chlorella-Mutante 5/520 durchgeführt hat, war es möglich, unter anaeroben Bedingungen die Xanthophyllbildung vollständig zu unterdrücken. Vorversuche an der Scenedesmus-Mutante C-6D zeigten, daß Belichtung unter anaeroben Bedingungen ebenfalls zu einer völligen Hemmung der Xanthophyll-Synthese führten. Unter derartigen Bedingungen gewachsene Kulturen wurden auf Ihre Photosynthesereaktionen untersucht. Tabelle 9 zeigt, daß unter

Parameter Probe	PCV	Atmung
Ausgangskultur	10,3	11,2
24 h unter N ₂	10,5	19,5

Tabelle 9 : Vergleich von PCV und Atmung einer 3 Tage bei Dunkelheit und 30°C gewachsenen Kultur und derselben Kultur nach 24 Stunden unter N₂-Begasung in Weißlicht von 15 000 Lux bei 30°C.

anaeroben Bedingungen keine PCV-Zunahme erfolgt. Sehr wahrscheinlich sind die Zellen nicht in der Lage, die für eine Neusynthese von größeren Substanzmengen benötigten Energieäquivalente bereitzustellen, denn durch den Sauerstoffaus-

schluß wird die Atmung als Energielieferant ausgeschaltet und wegen der CO_2 -Abwesenheit in der reinen Stickstoffatmosphäre wird eine photosynthetische CO_2 -Fixierung und damit ebenfalls die Bildung energiereicher Verbindungen gehemmt. Trotzdem ist es wahrscheinlich, daß die Algen in der Lage sind, ihre Energieversorgung in einem Maße aufrecht zu erhalten, welches noch einen gewissen Stoffumsatz erlaubt. Es ist bekannt, daß in Grünalgen unter anaeroben Bedingungen und CO_2 -Abwesenheit eine zyklische Photophosphorylierung stattfindet (URBACH und GIMMLER, 1970; SCHÜLER, 1975). Insbesondere in der Mutante C-6D mit ihrer hohen PS I-Aktivität, welche bei Belichtung sofort meßbar ist, sollte eine zyklische Phosphorylierung unter den genannten Bedingungen stattfinden können.

Die bei Dunkelheit unter aeroben Bedingungen im Oxygraph gemessene hohe Sauerstoffaufnahme muß nicht unbedingt durch die Atmung verursacht sein, es ist vielmehr wahrscheinlich, daß andere Sauerstoff-verbrauchende Reaktionen sofort sehr intensiv einsetzen, wenn die anaeroben Bedingungen aufgehoben sind. Eine dieser in Dunkelheit ablaufenden Reaktionen ist die Xanthophyllbildung. CLAES (1957 und 1958) konnte an der Mutante 5/520 (var. 11) zeigen, daß diese Reaktion nach Aufheben der anaeroben Bedingungen sofort in Dunkelheit anlief.

Die Photosynthesekapazität der anaerob belichteten Algen ist nur andeutungsweise vorhanden (Tabelle 10). Bei vollständiger Hemmung der Xanthophyllsynthese, so zeigten Voruntersuchungen, wird gar keine Photosynthesekapazität entwickelt.

An Chloroplastenpartikel-Suspensionen der Mutante C-6D ist keine PS II-Aktivität nachweisbar. Ähnlich wie im Falle der Nicotin-Hemmungsversuche

Reaktion Probe	Photosynthese rel./PCV (O ₂ -Entw.)	PS I	PS II H ₂ O → DCPIP DPC → DCPIP
ganze Zellen	1,7		
Rohpartikel	-	2019	-
F I	-	6831	-
F II		330,8	

Tabelle 10: Reaktionen von ganzen Zellen, Rohpartikeln und den nach Digitoninbehandlung und Gradientenzentrifugation erhaltenen Fraktionen I und II.

Die Kultur wurde für 24 Stunden unter anaeroben Bedingungen mit 15 000 Lux Weißlichtbestrahlt. Die Anzucht-Temperatur betrug 30°C. PS I-Akt. in $\mu\text{Mol red. DCPIP} \times \text{mg Chl}^{-1} \times \text{h}^{-1}$.

sind derart geringe Aktivitäten, wie sie durch die geringe Photosynthesekapazität angedeutet werden, nach dem Aufbrechen der Zellen nicht mehr meßbar. PS I zeigt demgegenüber eine mit der Dunkelkultur vergleichbare Kapazität.

3.4.2. Pigmente

Aus Tabelle 11 geht hervor, daß in den anaerob belichteten Algen eine starke Anreicherung von β -Carotin stattfindet. Um Vergleichsmöglichkeiten zu einer im Dunkel angezogenen Ausgangskultur zu geben, wurden in Tabelle II die für eine Dunkelkultur repräsentativen Werte mit dargestellt. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, daß die absoluten Pigmentmengen der Dunkelkultur und der belichteten Kultur nur bedingt vergleichbar sind, da die Dunkelkultur, deren Pigmentzusammensetzung hier zum Vergleich dient, nicht die Ausgangskultur für das Belichtungs-

Pigmente	absolut µg/ml PCV	in % von Chl. a	Dunkelkontrolle aus einem anderen Experiment µg/ml PCV
Σ -Carotin	73,3	34,3	156
cis-Neurosporin	-	-	36,7
all-trans-Neurosporin	12,5	5,8	20
cis-Lycopine	-	-	54,5
all-trans-Lycopin	Spuren	-	2
γ -Carotin	4,7	2,17	-
andere	47,0	21,75	-
β -Carotin	220	101,3	-
α -Carotin	Spuren	-	-
Carotine gesamt	(357,5)* 399,8	(165,3)* 187	268
Xanthophylle:			
Lut. + Zeax.	0,5	0,25	-
Violaxanthin	0,5	0,25	-
Chl. a	214	100	274
Chl. b	3,5	1,64	-
a/b	61,4	61,	-

Tab 11: Pigmentzusammensetzung einer für 24 Stunden

mit N₂ begasten Kultur der Scenedesmus Mutante C-6D. Der Vergleich erfolgt mit einer repräsentativen Dunkelkultur.

Die N₂-Kultur wurde für 24 Stunden mit 15000 Lux Weißlicht bei 30 °C bestrahlt. Die Pigmenttrennung erfolgte nach Hager und Meyer-Bertenrath (1966) und Williams (1971).

experiment war, sondern im Zusammenhang mit anderen Experimenten auf ihre Pigmentzusammensetzung untersucht wurde. Grundsätzlich sind die Werte der Dunkelkultur jedoch als repräsentativ anzusehen, wobei zu berücksichtigen ist, daß auch die Pigmentzusammensetzung verschiedener, miteinander verglichenen Dunkelkulturen Abweichungen zeigen. Außer dem akkumulierten β -Carotin ist in der unter N_2 belichteten Kultur γ -Carotin, eine monozyklische Zwischenstufe auf dem Syntheseweg zum β -Carotin, in deutlichen Mengen nachweisbar. Eine Chlorophyll a-Zunahme ist dagegen nicht feststellbar, Chlorophyll b ist jedoch in sehr geringen Mengen nachweisbar. Ergebnisse aus Untersuchungen machen es wahrscheinlich, daß die Photosyntheseaktivität und das zusätzliche Vorliegen von Chlorophyll b darauf beruhen, daß die Xanthophyllsynthese nicht völlig unterdrückt werden konnte. In 3.4.1. bereits erwähnten Vorversuchen zeigte es sich, daß bei völliger Unterbindung der Xanthophyllsynthese kein Chlorophyll b gefunden werden konnte und keine Photosynthesekapazität vorhanden war. Die beschriebenen Untersuchungen zeigen somit, daß die Synthese der zyklischen Carotine nicht mit einer Chlorophyllsynthese korreliert. Vielmehr scheint eine Chlorophyllsynthese nur unter Bedingungen stattzufinden, unter denen auch Xanthophylle gebildet werden. Ebenfalls entwickelt sich in der Mutante C-6D erst unter "Xanthophyllsynthese-Bedingungen" die Photosynthesekapazität, d.h. im speziellen Falle dieser Mutante eine PS II-Kapazität.

3.4.3. Entwicklung der Struktur

3.4.3.1. Fraktionen im Saccharose-Gradienten, Reaktionen und spektroskopische Eigenschaften

Wie schon bei der Untersuchung der Hemmung der Zyklisierungsreaktion der Carotinoide wurde bei einer unter anaeroben Bedingungen unter Licht gewachsenen Kultur die Struktur mit Hilfe der Gradientenzentrifugation von Digitonin-behandelten Chloroplastenpartikeln untersucht. Abb. 34 zeigt die im Gradienten auftretenden Banden.

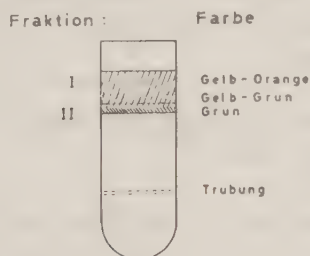


Abb. 34 : Verteilung von Chloroplasten-Subpartikeln im Saccharose-Gradienten. Die Partikel stammten von einer durch N_2 -Begasung in der Xanthophyllbildung gehemmten Kultur der Scenedesmus-Mutante C-6D. Subpartikel wurden durch Digitoninbehandlung der Chloroplastenfragmente erhalten. Konzentration des Gradienten : Oberkante Fraktion I = 10%; Boden des Zentrifugenröhrchens 66%.

Bande I ist gelb-orange gefärbt und zeigt eine sehr hohe PS I-Aktivität (s. Tabelle 10). Im unteren Bereich zeigt Bande I eine gelb-grünliche Farbe.

Die Bande II ist ähnlich wie Bande II_x im Saccharose-Gradienten der Dunkelkultur von Bande I schwach abgesetzt.

Im unteren Bereich hoher Dichte befindet sich eine trübe Zone, die nicht näher untersucht wurde, da sich in ihr keine Pigmente befanden. Insgesamt bietet die Anordnung der Banden und ihre Aktivität ein der Dunkelkultur sehr ähnliches Bild, woraus der Schluß gezogen werden muß, daß bei Belichtung unter anaeroben Bedingungen nur sehr geringe Veränderungen in den Algen stattfinden.

3.4.3.2. Spektroskopische Charakterisierung der Banden

Wie die chromatographische Trennung eines Methanol-Extraktes der unter N₂ im Licht gewachsenen Zellen gezeigt hat (Tabelle 11) ist β -Carotin das dominierende Pigment dieser Kultur. Entsprechend sind auch die Absorptionsspektren der Zellen (hier nicht dargestellt) und die Absorptionsspektren der Fraktion I und II stark von der Anwesenheit des β -Carotins beeinflusst.

Abb. 35 a zeigt das Absorptionsspektrum von Fraktion I bei Raumtemperatur. Im Spektrum überlagern sich Chlorophyll a (Absorptionsmaximum bei 436 nm) und β -Carotin (Schultern bei 465 und 485 nm). Im Tieftemperatur-Absorptionsspektrum werden die Absorptionsmerkmale der beteiligten Pigmente stärker hervorgehoben. Die drei kurzwelligen Maxima, deren langwelligstes sich bei 438 nm befindet, beruhen auf der Chlorophyll a-Absorption, die Maxima bei 462- und 487 nm auf der

β -Carotin-Absorption. In Fraktion II ist das Mengenverhältnis beider Pigmente verändert. Während in Fraktion I β -Carotin angereichert ist, überwiegt in Fraktion II das Chlorophyll a (Abb. 37a und b). Im Raumtemperaturabsorptionsspektrum deutet nur noch eine tief liegende Schulter bei 490 nm auf die Anwesenheit des β -Carotins hin. Die Chl. a-Maxima im Tieftemperaturspektrum der Fraktion II treten bei den gleichen Wellenlängen auf, wie in Fraktion I, die kurzwellige β -Carotin-Absorption ist nur noch zu einer Schulter ausgebildet, das langwellige Maximum liegt bei 490 nm.

Das nur in sehr geringen Mengen vorhandene Chlorophyll b ist für den unregelmäßigen Kurvenverlauf im Minimum bei 650 nm verantwortlich.

In den Fluoreszenzanregungsspektren Abb. 36 (Fraktion I) und Abb. 38 (Fraktion II) fehlen Indizien, die auf eine Energieübertragung von β -Carotin auf Chlorophyll a hinweisen.

Der Anregungsbereich oberhalb 450 nm weist im Spektrum der F_1 trotz des sehr hohen β -Carotiningehaltes nur eine minimale Schulter auf.

Im Spektrum der Fraktion II ist diese Schulter, obwohl weniger β -Carotin vorhanden ist als in Fraktion I deutlicher ausgeprägt, mit einem Plateau von 470-480 nm.

Unter den geschilderten Bedingungen, so konnte gezeigt werden, kommt es in der Scenedesmus-Mutante C-6D zu einer Anreicherung von β -Carotin. Das Absorptionsspektrum ist zwar stark durch β -Carotin geprägt, zeigt jedoch bei Raumtemperatur keine deutliche Auflösung im Bereich oberhalb 450 nm. Die Lage der β -Carotin-Maxima ist im Vergleich mit Daten bei GOEDHEER (1969) allgemein weiter zum kurzwelligen Bereich ver-

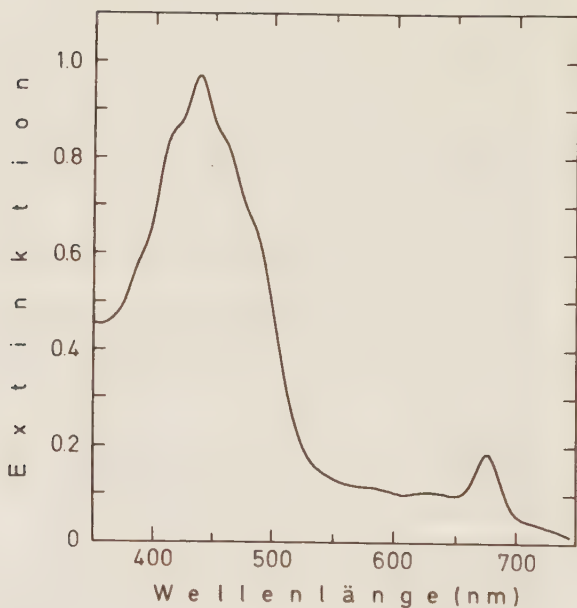


Abb. 35a: Raumtemperatur-Absorptionsspektrum der Fraktion I einer Dichtegradientenzentrifugation von Digitonin-behandelten Chloroplastenpartikeln, erhalten aus einer unter N_2 -Begasung in der Xanthophyllbildung gehemmten Kultur der Scenedesmus Mutante C-6D.

Die Aufnahme des Absorptionsspektrums erfolgte in einem Shimadzu MPS-5000 Zweistrahlphotometer.

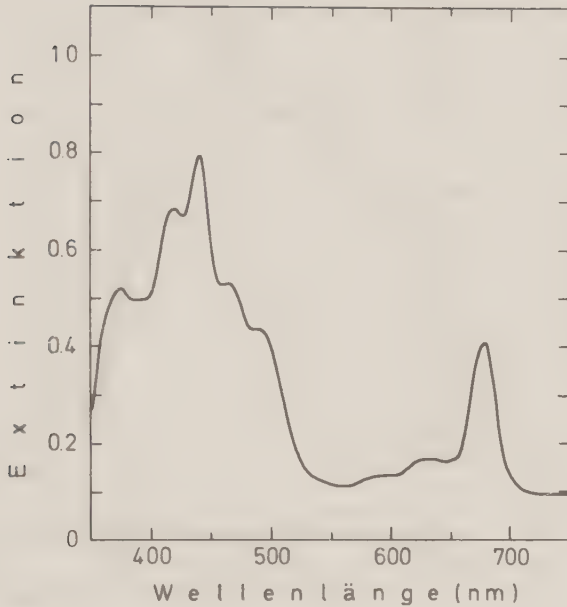


Abb. 35b: Tieftemperatur-Absorptionsspektrum der Fraktion I einer Dichtegradientenzentrifugation von Digitonin-behandelten Chloroplastenpartikeln, erhalten aus einer unter N_2 -Begasung in der Xanthophyllbildung gehemmten Kultur der Scenedesmus Mutante C-6D.
Die Aufnahme des Absorptionsspektrums erfolgte in einem Shimadzu MPS-50L.



Abb. 36: Fluoreszenzspektrum bei Raumtemperatur, der Fraktion II einer Dichtegradientenzentrifugation von Digitonin-behandelten Chloroplastenpartikel, erhalten aus einer unter N_2 -Begasung in der Xanthophyllbildung gehemmten Kultur der Scenedesmus Mutante C-6D. Das Spektrum wurde in einem automatisch auf quantengleiches Licht korrigierenden Shimadzu RF-502 Fluorimeter gemessen.
Die Messung der Emission erfolgte bei 685 nm.

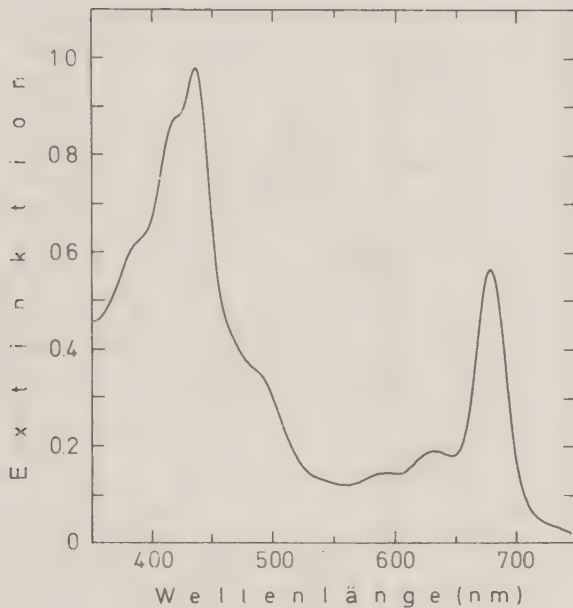


Abb. 37a: Raumtemperatur-Absorptionsspektrum der Fraktion II einer Dichtegradientenzentrifugation von Digitonin-behandelten Chloroplastenpartikeln, erhalten aus einer unter N_2 -Begasung in der Xanthophyllbildung gehemmten Kultur der Scenedesmus Mutante C-6D.

Die Aufnahme des Absorptionsspektrums erfolgte in einem Shimadzu MPS-5000 Zweistrahlsspektralphotometer.

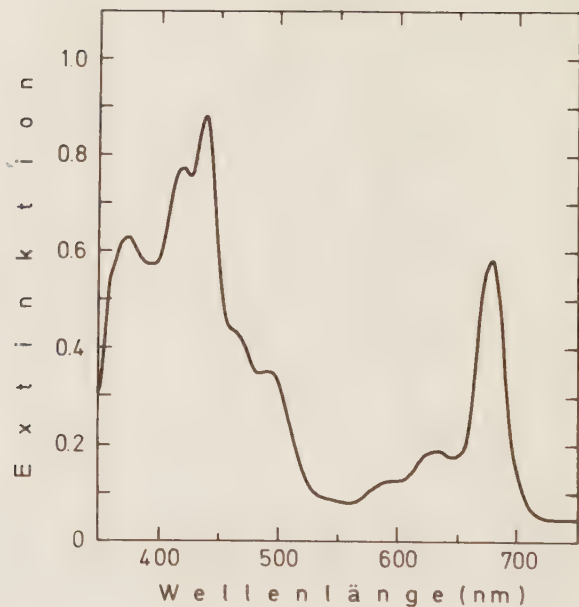


Abb.37b: Tieftemperatur-Absorptionsspektrum der Fraktion II einer Dichtegradientenzentrifugation von Digitonin-behandelten Chloroplastenpartikeln, erhalten aus einer unter H_2 -Begasung in der Xanthophyllbildung gehemmten Kultur des Scenedesmus Mutante C-6D.

Die Aufnahme des Absorptionsspektrum erfolgte in einem Shimadzu MPS-50L.

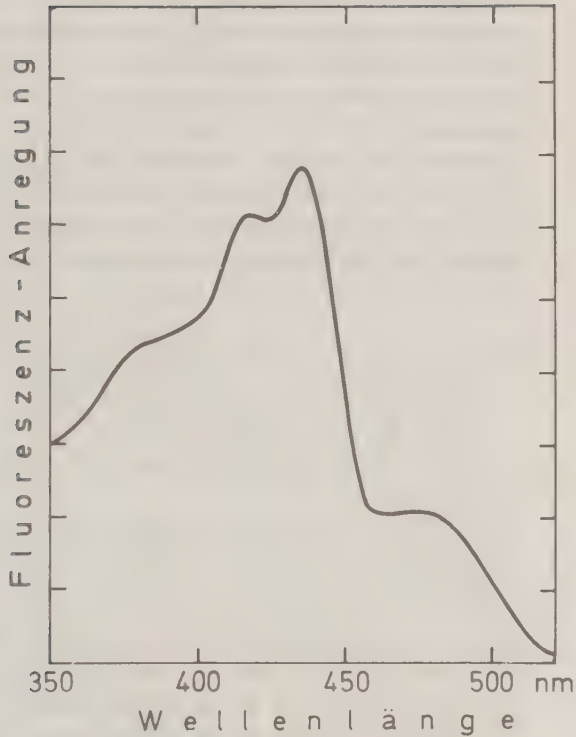


Abb. 38: Fluoreszenzanregungsspektrum bei Raumtemperatur der Fraktion II einer Dichtegradientenzentrifugation von Digitonin-behandelten Chloroplastenpartikeln, erhalten aus einer unter N_2 -Begasung in der Xanthophyllbildung gehemmten Kultur der Scenedesmus Mutante C-6D.

Das Spektrum wurde in einem automatisch auf quantengleiches Licht korrigierenden Shimadzu RF-502 Fluorimeter gemessen. Die Messung der Emission erfolgte bei 685 nm.

schoben. Außerdem zeigt es sich, daß in der Scenedesmus-Mutante C-6D unter Bedingungen, unter denen β -Carotin akkumuliert wird, die Chlorophyll b-Bildung stark eingeschränkt wird und eine Energieübertragung von β -Carotin auf Chlorophyll a nicht nachgewiesen werden kann. GOEDHEER (1965, 1969) konnte demgegenüber an der Chlorophyll b-freien Grünalge Tribonema equale einen direkten Energietransfer von β -Carotin auf Chlorophyll a nachweisen. Mögliche Ursachen für den nicht stattfindenden Energietransfer von β -Carotin auf Chlorophyll a sind:

1. Es bedarf einer bestimmten räumlichen Beziehung zwischen β -Carotin und Chlorophyll a, unter der ein Energietransfer möglich ist - diese Beziehung würde dann in der Mutante C-6D unter den beschriebenen Bedingungen nicht vorliegen.
2. Es bedarf eines Vermittlers (in diesem Falle Chlorophyll b), der die Energie von β -Carotin übernimmt und auf Chlorophyll a weiterleitet.

Trotz der Aufhebung des Blocks in der Biosynthesekette der Carotinoide, die zur Umwandlung der azyklischen Carotine in zyklische Formen führt, findet keine Entwicklung des Photosyntheseapparates bzw. keine Aktivierung von PS II statt. Entweder bedarf es zur Aktivierung der fehlenden Xanthophylle, oder einer bei den bisherigen Untersuchungen nicht erfaßten Komponente. Die in den Gradienten im Bereich der Bande IV auftretenden Trübungszonen enthalten möglicherweise Trägerproteine für Pigmente, die bei Belichtungsbeginn synthetisiert werden, dann jedoch nicht verwendet werden können.

4. Schlußfolgerungen

In der heterotroph in Dunkelheit kultivierten *Scenedesmus*-Mutante C-6D liegen nur azyklische Carotinoid-Vorstufen und Chlorophyll a vor.

Bei Belichtung ergrünt die Mutante, wobei unmittelbar nach Einsetzen der Belichtung die Bildung von zyklischen Carotinen und Xanthophyllen einsetzt. Dies geschieht in den ersten 4-6 Ergrünungsstunden ausschließlich auf Kosten der akkumulierten Carotinoid-Vorstufen. Eine zusätzliche Synthese von Carotinoiden beginnt erst nach dieser Zeit.

Chlorophyll a und b nehmen nach einer 1-2-stündigen Lag-Phase ebenfalls zu. Der maximale Pigmentgehalt bezogen auf PCV wird nach 24 Stunden erreicht. Ebenfalls unmittelbar nach Belichtungsbeginn setzt die Entwicklung des Photosyntheseapparates ein, die in der steigenden Photosynthesekapazität zum Ausdruck kommt. Untersuchungen der PS I- und PS II-Aktivitäten während der Ergrünung der Mutante haben gezeigt, daß die Entwicklung der Photosynthesekapazität der Entwicklung bzw. der Aktivierung von PS II folgt. Durch Einsetzen von DPC, einem künstlichen Elektronendonator für PS II, konnte keine Steigerung der PS II-Aktivität erzielt werden; womit das wasserspaltende System als Engpaß der PS II-Entwicklung ausgeschlossen werden kann. Auch bei hohen Belichtungsintensitäten steigen die Lichtintensitätskurven der photosynthetischen Sauerstoffentwicklung noch weiter an. Dies zeigt, daß die enzymatischen Dunkelreaktionen zu frühen Ergrünungszeiten noch nicht limitierend sind. Ebenfalls scheidet wegen der ausgeprägten PS I-Charakteristik (1. Depression) in der

Fluoreszenzinduktionskurve anfänglicher Ergrünungsstadien, eine mögliche Begrenzung der PS II-Reaktionen durch Aktivierung von Redoxsystemen der Elektronentransportkette als begrenzender Schritt aus.

Die Aktivierung des PS II muß sich daher im engsten Bereich des Pigmentsystems II abspielen. Aus der Pigmentanalyse, der Aufnahme von Ableitungsspektren und der Messung des Kautsky-Effektes geht hervor, daß während der ersten Ergrünungsstunde keine meßbare Chlorophyllsynthese stattfindet. Da während dieser Zeit kein Chlorophyll b nachgewiesen werden kann, ist die Aktivierung des PS II von Chlorophyll b unabhängig.

Die mögliche Aktivierung von PS II durch die Modifizierung von vorhandenem Chlorophyll a konnte mit den verwendeten Methoden nicht erfaßt werden. Die Bildung bestimmter an spezielle Proteine gebundene Chlorophyll a-Formen konnte frühestens zwischen 1. und 2. Belichtungsstunde im Absorptionsspektrum der Algenzellen in Form einer Verschiebung des Chlorophyll a-Absorptionsmaximums bei 674 nm zu größeren Wellenlängen festgestellt werden.

Digitoninbehandlung von Chloroplastenpartikeln der Dunkelkultur und deren anschließende Auftrennung im kontinuierlichen Saccharose-Dichtegradienten ergaben eine leichte Bande (I) mit sehr hoher PS I-Aktivität. Diese Bande I enthielt außer Carotinoid-Vorstufen nur Chlorophyll a.

Während der Ergrünung bleibt die Bande I weiter bestehen, es treten jedoch zusätzlich geringe Mengen Chlorophyll b und die Carotinoid-Endstufen in ihr auf.

Zusätzlich zu dieser leichten Bande entwickeln sich während der Ergrünung spezifisch schwere Banden mit PS II-Aktivität. Die spezifisch dichteste von ihnen, Bande IV, wird als Repräsentant von "Stacked" Thylakoid-Fragmenten, die leichte Bande I als PS I-Partikel-Fraktion angesehen, die

sowohl aus Stroma als auch aus "Stacked"-Thylakoiden stammen kann.

Die Bezeichnung "Stacked"-Thylakoide wurde verwendet für in engem Kontakt parallel verlaufende Thylakoid-Membranen, die mit Grana-Thylakoiden Höherer Pflanzen homologisierbar sind, jedoch nicht mit diesen verwechselt werden sollten. Die Hemmung der Carotinoidsynthese mit Nicotin führt zu einer Akkumulierung von all-trans-Lycopin und einer weitgehenden Einschränkung der Synthese zyklischer Carotinoide. β -Carotin liegt nur noch in ca. 7% der Gesamt-Carotine vor, Xanthophylle waren nicht nachweisbar.

Wie die Versuche mit Nicotin zeigen, ist auch die Isomerisierungsreaktion der Carotinoide in der Mutante lichtabhängig.

Lycopin, das Haupt-Carotin mit 11- und Neurosporin mit 9 konjugierten Doppelbindungen im Molekül können die Algen nicht vor einer photooxidativen Schädigung schützen. Die Ergrünung der Algen unter normalen Kulturbedingungen beruht somit nicht darauf, daß die akkumulierten Carotine bereits einen Schutz gewährleisten, sondern darauf, daß sofort bei Belichtungsbeginn die Synthese schutzfähiger Carotinoide einsetzt. Das Abnehmen des Chlorophylls in den Algen wird zwar durch die photooxidative Zerstörung des Pigmentes verständlich, setzt jedoch voraus, daß die Photooxydation die Neusynthese des Chlorophylls weit übertrifft.

Ein direkter Effekt des Nicotins auf die Entwicklung der Algenmutante konnte nicht nachgewiesen werden. Auch die Chlorophyll-Synthese wird nicht direkt durch Nicotin beeinflusst.

So wird bei Dunkelheit unter Nicotin-Anwesenheit Chlorophyll a in normaler Rate synthetisiert. Würde Nicotin die Chlorophyll b-Synthese hemmen,

so könnte unter 10^{-4} M Nicotin in den Algen nicht die gleiche Chlorophyll b-Menge wie in der parallel ergrünenden Kontrolle synthetisiert werden. Aus den genannten Gründen kann nur ein indirekter Effekt des Nicotins auf die Chlorophyllsynthese gefolgert werden, welcher sehr wahrscheinlich über die Hemmung der Synthese schutzfähiger Carotinoide zustande kommt. Dafür spricht das relativ konstante Verhältnis zwischen Chlorophyllen und zyklischen Carotinoiden.

Eine über die Synthese von Membranproteinen erfolgende Kopplung der Carotinoid- mit der Chlorophyllsynthese wäre ebenfalls denkbar, müßte jedoch noch experimentell geprüft werden.

Mit dem Einfluß des Nicotins auf die Carotinoide ist eine Hemmung der Entwicklung des Photosyntheseapparates verbunden. PS II, die entwicklungsbestimmende Einheit der Mutante C-6D, wird nicht aktiviert. Die Ausprägung der Banden im Saccharosegradienten zeigt, daß ein "Stacking" der Thylakoide nicht stattfindet, obwohl die Trübung im dichten Bereich des Gradienten andeutet, daß es zu einer Synthese von wahrscheinlich den Thylakoidmembranen zuzurechnenden Proteinen und somit dem Einsetzen einer Membranentwicklung kam.

Auch bei der Hemmung der Xanthophyllsynthese durch Sauerstoffausschluß findet keine Aktivierung von PS II statt. Mit der Hemmung der Xanthophyllsynthese ist gleichzeitig die Bildung von Chlorophyll b unterbunden. Daß das Fehlen von Chlorophyll b als Ursache für die Nicht-Entwicklung von PS II ausscheidet, geht aus der Kinetik der "normalen" Ergrünung hervor, in der Chlorophyll b nicht nachweisbar ist und trotzdem die Ergrünung bzw. die PS II-Aktivierung stattfindet.

Sowohl die Ergebnisse der Nicotin-Hemmungsversuche, als auch die bei der Untersuchung der Xanthophyllsynthese unterbleibende PS II-Aktivierung machen es wahrscheinlich, daß die PS II-Aktivierung der Mutante C-6D mit der Xanthophyllbildung gekoppelt ist.

Die Aufnahme der Fluoreszenzanregungsspektren zeigt, daß in den Partikelfractionen der Dunkelkultur ausschließlich Chlorophyll a für die Fluoreszenzemission verantwortlich ist.

An der voll ergrünten Kultur läßt sich in jeder Gradientenfraction die Energieübertragung von Carotinoiden und Chl b auf Chl a nachweisen. Besonders deutlich wird dies in Abb. 27 a durch die zwei oberhalb von 450 nm auftretenden Anregungsmaxima. Da Chlorophyll b zwischen 470 und 475 sein Absorptionsmaximum hat, aber alle Anregungsmaxima der Gradientenfraction II, III und IV bei 480 nm liegen, müssen auch noch ein oder mehrere Carotinoide an der Fluoreszenzanregung von Chlorophyll a mitwirken. Deutlich wird in allen Anregungsspektren, daß die Fluoreszenzanregung oberhalb von 450 nm nicht mit dem Carotinoidgehalt der Fractionen korreliert.

Vielmehr ist Chlorophyll b essentiell an der Ausbildung des Anregungsmaximums beteiligt. Insbesondere die Anregungsspektren der unter anaeroben Bedingungen belichteten Algen, in denen β -Carotin akkumuliert ist, stützen diesen Befund.

Entsprechend dem geringen Chlorophyll b-Gehalt der Algen ist die Anregung oberhalb 450 nm in Fraction I äußerst gering, in Fraction II mit geringerem β -Carotin-Gehalt jedoch höher. Da es bei der Gradiententrennung von Chloroplasten-Subpartikeln bei Anwesenheit von Chlorophyll b in Fraction II stets zu einer Anreicherung von Chlorophyll b-haltigen Partikeln kommt (vgl.

z.B. a/b-Verhältnisse der Gradiententrennung einer normal ergrüntten Kultur), folgt die Anregung der Chlorophyll a-Fluoreszenz auch im Falle der anaerob belichteten Kultur dem Chlorophyll b-Gehalt der Gradientenfraktionen.

5. Zusammenfassung

1. In der Scenedesmus-Mutante C-6D findet eine lichtabhängige Entwicklung von Photosynthese-Reaktionen und -Strukturen statt, die parallel zu Veränderungen in der Pigmentzusammensetzung und -menge abläuft.
2. Die Messung der PS I- und PS II-Kapazität während der Ergrünung haben ergeben, daß der limitierende Schritt bei der Aktivierung der Photosynthesekapazität die Entwicklung von PS II ist.
3. Die Ersetzung der Wasserspaltung durch den künstlichen Elektronendonator DPC, die Messung der PS II-Reaktion als pBQ-Hill-Reaktion und der Verlauf der Fluoreszenzinduktionskurven an frühen Ergrünungsstadien schließen limitierende Schritte im Bereich der Wasserspaltung und im Bereich der Elektronentransportkette aus und zeigen, daß die Aktivierung im zentralen Bereich von PS II, dem Pigmentsystem, stattfindet.
4. In der ersten Ergrünungsstunde, in der die Gesamt-Photosynthese-Reaktion pro PCV bereits auf 25% ihres Maximalwertes ansteigt, findet keine meßbare Chlorophyll b-Synthese statt. Sowohl im Chromatogramm, als auch in der 1. Ableitung der Absorptionsspektren ist Chlorophyll b in dieser Zeit nicht nachweisbar. Es muß daher angenommen werden, daß die PS II-Aktivierung in der Mutante C-6D Chlorophyll b-unabhängig ist.
5. Qualitative Veränderungen in der Chlorophyll a-Zusammensetzung während der frühen Ergrünungsphase konnten nicht gemessen werden, sind jedoch nicht ganz auszuschließen.

6. Hemmungsversuche mit 10^{-3} M Nicotin bewirken eine Blockierung der Carotinoidsynthese auf der Stufe des Lycopins und werden von einem photooxydativen Chlorophyllabbau begleitet. Die den Carotinoiden mit 9 und mehr konjugierten Doppelbindungen im Molekül zugesprochene Fähigkeit, Organismen vor Photooxydation zu schützen, kann durch die azyklischen Vorstufen Lycopin und Neurosporin in der Scenedesmus-Mutante C-6D demnach nicht erfüllt werden. Verantwortlich für den Schutz vor photooxydativer Schädigung der Algen sind, nach den vor allem in Tab. 5c dargestellten Ergebnissen, die zyklischen Carotinoide, deren Synthese unmittelbar mit der Belichtung der Mutante einsetzt, und wodurch eine Ergrünung überhaupt erst möglich wird.
7. Nicotin bewirkt eine Einschränkung der Chlorophyllsynthese, die nicht auf einer direkten Hemmung beruht. Daß Nicotin die Chlorophyllsynthese primär nicht hemmt, wird belegt durch:
- a) Unter 10^{-3} M Nicotin findet in Dunkelheit eine normale Chlorophyll a-Synthese statt.
 - b) Unter 10^{-4} M findet bei Belichtung eine relative Anreicherung von Chlorophyll b, im Vergleich zu einer parallel ohne Nicotin-Zusatz ergrünenden Kontrolle, statt.

Aufgrund der in Tab. 5c (S. 117) zum Ausdruck kommenden Korrelation zwischen dem Chlorophyllgehalt und dem Gehalt an zyklischen Carotinoiden in den Algenzellen, ist die Einstellung einer bestimmten Chlorophyllkonzentration auf das Vorliegen einer definierten Menge schutzzfähiger Carotinoide (zyklische Carotinoide) zurückzuführen.

8. Die Wirkung der Carotinoide als akzessorische Pigmente konnte durch korrigierte Fluoreszenzanregungsspektren ("Fluoreszenzaktionspektren") verschiedener Fraktionen der Partikel-Trennungen eindeutig nachgewiesen werden. Der Transfer hängt jedoch sehr wahrscheinlich von der Anwesenheit von Chlorophyll b ab.
9. Durch Einsatz von 10^{-3} M Nicotin wird die Carotinoid-Synthese auf der Stufe des Lycopins, durch Begasung mit N_2 auf der Stufe des β -Carotins unterbrochen. In beiden Fällen findet keine PS II Aktivierung statt.
Da die Aktivierung von PS II unabhängig von der Chlorophyll b-Synthese erfolgt (S. 4), die Aktivierung jedoch bei Unterbrechung der Carotinoidsynthese auf der Stufe des Lycopins oder auf der Stufe des β -Carotins nicht stattfindet, ist eine Beteiligung der Carotinoide (möglicherweise der Xanthophylle) an diesem Aktivierungsschritt wahrscheinlich. Dabei kann die Beteiligung einer unter den experimentellen Bedingungen nicht erfaßten Komponente jedoch nicht ausgeschlossen werden.
10. In Verbindung mit der Hemmung der Carotinoid-Synthese durch Nicotin und N_2 wird die Bande IV im Saccharose-Gradienten nicht ausgebildet, was anzeigt, daß die Bildung höher organisierter Thylakoidstrukturen unter Bedingungen, unter denen keine Xanthophylle synthetisiert werden können, nicht stattfindet.

6. Nomenklatur der Carotinoide

Für die Carotinoide wurde 1971 von der "Commission on Biochemical Nomenclature" ein neues halbsystematisches Nomenklatorsystem eingeführt, dessen Grundzüge, soweit sie für diese Arbeit relevant sind, kurz vorgestellt werden.

Alle spezifischen Namen basieren auf dem Stammnamen "Carotin". Der Name eines bestimmten Carotinoids wird durch das Hinzufügen zweier Buchstaben des griechischen Alphabetes als Präfix zum Stammnamen gebildet. Die Präfixe wurden den charakteristischen C_9 -Endgruppen der Carotinoidmoleküle zugeordnet (Abb. 2). Die Reihenfolge der griechischen Buchstaben folgt dem Alphabet, zwischen dem letzten Buchstaben und dem Stammnamen wird ein Bindestrich gesetzt. Eine Veränderung im Hydrierungszustand wird durch die Präfixe "Dehydro" und "Hydro" angezeigt. In den sauerstoffhaltigen Carotinoiden den Xanthophyllen, werden Sauerstoffbrücken durch das Präfix "Epoxy"- und Gruppen, welche formal durch die Addition der Elemente des Wassers erhalten werden (-OH) durch das Präfix "Hydroxy" gekennzeichnet.

Die Numerierung der einzelnen Kohlenstoffatome folgt dem Schema (Abb. 2).

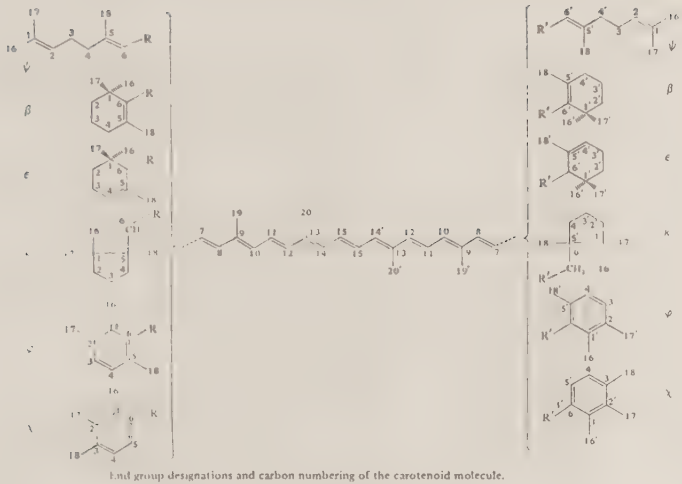


Abb. 2 : Numerierung und Endgruppenbezeichnung
der Carotinoid-Moleküle.
Aus DAVIES (1976).

Im folgenden werden die halbsystematischen Namen der im Text am häufigsten erwähnten Carotinoide dargestellt:

Phytoen	: 7,8,11,12,7',8',11',12'-Octahydro- ψ,ψ -Carotin
Phytofluen	: 7,8,11.12.7',8'-Hexahydro- ψ,ψ -Carotin
ζ -Carotin	: 7,8,7',8'-Tetrahydro- ψ,ψ -Carotin
Neurosporin	: 7,8 -Dihydro- ψ,ψ -Carotin
Lycopin	: ψ,ψ -Carotin
χ -Carotin	: 7,8,7',8'-Tetrahydro- ψ,ψ -Carotin
α -Carotin	: β,ϵ -Carotin
β -Carotin	: β,β -Carotin
Lutein	: 3,3'-Dihydroxy- β,ϵ -Carotin
Zeaxanthin	: 3,3'-Dihydroxy- β,β -Carotin
Antheraxanthin	: 5,6 -Epoxy-3,3'-Dihydroxy-5,6-Didehydro- β,β -Carotin
Violaxanthin	: 5,6,5',6'-Diepoxy-3,3'-Dihydroxy-5,6,5',6'-Tetrahydro- β,β -Carotin
Loroxanthin	: 3,19,3'-Trihydroxy- β,ϵ -Carotin
Neoxanthin	: 5',6'-Epoxy-6,7-Didehydro-5,6,5',6'-Tetrahydro- β,β -Carotin-3,5,3'-Triol
Fucoxanthin	: 5,6-Epoxy-3,3',5'-Trihydroxy-6',7'-Didehydro-5,6,7,8,5',6'-Hexahydro- β,β -Carotin-8-on 3'-Acetat

Wegen der Schwerfälligkeit des Systems werden allgemein die Trivialnamen -z.T. mit Hinweisen auf die zusammengefaßte halbsystematische Nomenklatur versehen - in Texten weiterverwendet.

7. Literatur

- ANDERSON, J.M. (1975): The Molekular Organization of Chloroplast Thylakoids. Biochim.Biophys. Acta 416, 191
- BACHMANN, M.D., ROBERTSON, D.S., BROWN, C.C. and ANDERSON, J.C. (1967): Chloroplast Development in Pigment-Deficient Mutants of Maize. J. Ultrastruct.Res. 21, 41-60
- BATRA, P., GLEASON, R.M. and LANDA, J.W. (1973): Cyclization of Lycopene in the Biosynthesis of β -Carotene. Phytochem. 12, 1309
- BAUER, R. (1972): Die Photomorphogenese des photosynthetischen Apparates grüner Pflanzen untersucht mit Hilfe des Kautsky-Effektes. Dissertations-Arbeit an der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen.
- BAUER, R. and FRANK, U.F. (1974): Light-Induced Variable Photosystem II Chlorophyll Fluorescence Indicator for Photosystem I Activity. Proc. Int. Congr. Photosynth. Res. 3rd 1974, p. 171. Ed. Avron, M. Elsevier Scientific Publishing Comp., Amsterdam.
- BECKER, K. and LICHTENTHALER, H.K. (1974): Formation of Individual Carotenoid Components in Rhabanus Etioplasts in Continuous Far-Red and White Light. Z. Pflanzenphys. Bd. 75, 303-306.
- BEN-HAYYIM G. and MALKIN, S. (1971): Kinetic Studies on C 550 and its Correlation to the Fluorescence Induction in Isolated Chloroplasts. Proc. Int. Congr. Photosynth. Res. 2nd, 1971, p. 61.

- BERZBORN, R.J. and BISHOP, N.I. (1973):
Isolation and Properties of Chloroplast
Particles of *Scenedesmus obliquus* D₃ with
High Photochemical Activities. *Biochem.*
Biophys. Acta 292, 700-714.
- BISHOP, N.I. & SENGHER, H. (1971): Preparation and
Photosynthetic Properties of Synchronous
Cultures of *Scenedesmus*. *Methods in Enzymology*
23, part A Edited by A. San Pietro, p. 130-
140, Academic Press New York.
- BISHOP, N.I. and SENGHER, H. (1972): The Develop-
ment of Structure and Function in Chloroplasts
of Greening Mutants of *Scenedesmus*.
II. Development of the Photosynthetic Appa-
ratus. *Plant and Cell Physiol.* 13: 937-953.
- BLINKS, L.R. (1964): Accessory Pigments and Photo-
synthesis. *Photophysiology I*, 199, Ed. by
A.C. Giese/Acad. Press New York, London.
- BOARDMAN, N.K., THORNE, S.W., ANDERSON, J.M.
(1966): Fluorescence Properties of Particles
Obtained by Digitonin Fragmentation of
Spinach Chloroplasts. *Proc. Nat. Acad. Sci.*
US, 56, 586.
- BÖHME, H., REIMER, S. and TREBST, A. (1970):
The Effect of Dibromothymoquinone, an Anta-
gonist of Plastoquinone, on Non Cyclic and
Cyclic Electron Flow Systems in Isolated
Chloroplasts. *Z. Naturforsch.* 266, 341-352.
- BROWN, J.S. (1973): Separation of Photosynthetic
Systems I and II. *Photophysiol. VIII*, Ed by
A.C. Giese, Acad. Press New York, London
p. 97.

- BURNETT, I.H. (1976): Functions of Carotenoids Other than in Photosynthesis. In: Chem. and Biochem. of Plant Pigments ed. T.W. Goodwin, Academic Press London p. 665.
- BUTLER, W.L., ERIXON, K. and OKAYAMA, S. (1971): The Primary Photochemical Reaction of Photosystem II. Proc. Int. Congr. Photosynth. Res. 2nd, 1971 p. 73.
- CLAES, H. (1954): Analyse der biochemischen Synthesekette für Carotinoide mit Hilfe von Chlorella-Mutanten. Z. Naturforsch. 9b, 461.
- CLAES, H. (1957): Biosynthese von Carotinoiden bei Chlorella III. Untersuchungen über die lichtabhängige Synthese von α - und β -Carotin und Xanthophyllen bei der Chlorella-Mutante 5/520. Z. Naturforsch. 12 b, 401.
- CLAES, H. (1958): Biosynthese von Carotinoiden bei Chlorella IV. Die Carotinoidsynthese einer Chlorella-Mutante bei anaerober Belichtung. Z. Naturforsch. 13 b, 222.
- CLAES, H. (1959): Biosynthese von Carotinoiden bei Chlorella V. Die Trennung von Licht- und Dunkelreaktionen bei der lichtabhängigen Xanthophyllsynthese von Chlorella. Z. Naturforsch. 14 b, 4.
- CLAES, H., & T.O.M. NAKAYAMA (1959): Isomerization of Poly-cis-Carotenes by Chlorophyll in vivo and in vitro. Nature 183, 1053.
- CLAES, H. (1966): Maximal Effectiveness of 670 nm in the Light Dependend Carotenoid Synthesis in Chlorella vulgaris. Photochem. Photobiol. 5, 515.

- CZYGAN, F.C. (1968): Sekundär-Carotinoide in Grünalgen I. Chemie, Vorkommen und Faktoren, welche die Bildung dieser Polyene beeinflussen. Arch. Microbiol. 61, 81-102.
- DAVIES, B.H. (1975): Carotenoids-Aspects of Biosynthesis and Enzymology. Ber. Deutsch. Bot. Ges. 88,7.
- DAVIES, B.H. (1976): Carotenoids. In: T.W. Goodwin Chem. and Biochem. of Plant Pigments. Ed. by T.W. Goodwin Academ. Press New York, London II, p. 38.
- DE GREEF, J. BUTLER, W.L. and ROTH, T.F. (1971): Greening of Etiolated Bean Leaves. Plant Physiol. 47, 457.
- DEROCHE, M.E. and BRIANTAIS, J.M. (1974): Absorptions Spectra of Chlorophyll Forms, β -Carotene and Lutein in Freeze-Dried Chloroplasts. Photochem. Photobiol. 19, 235-240.
- DERSCH, G. (1960): Mineralsalz-mangel und Sekundär-carotinoide in Grünalgen. Flora (Jena) 149, 566-603.
- DUBERTRET, G. and JOLIOT, P. (1974): Structure and Organization of System II Photosynthetic Units During the Greening of a Dark-Grown Chlorella Mutant. Biochim. Biophys. Acta 357, 399.
- DUTTON, H.J., W.M. MANNING, B.M. DUGGER (1943): Chlorophyll Fluorescence and Energy Transfer in the Diatom Nitzschia closterium. J. Phys. Chem. 47, 308.
- EGNEUS, H., REFTTEL, S. and SELLDEN, G. (1972): The Appearance and Development of Photosynthetic Activity in Etiolated Barley Leaves and Isolated Etio-Chloroplasts. Physiol. Plant. 27, 48.

- ENGELMANN, T.W. (1884): Untersuchungen über die quantitativen Beziehungen zwischen Absorption des Lichtes und Assimilation in Pflanzenzellen. Botanische Zeitung 42, 81.
- EPEL, B.L. and NEUMANN, J. (1973): The Mechanism of the Oxidation of Ascorbate and Mn^{2+} by Chloroplasts. Biochim. Biophys. Acta 325, 520.
- FLEISCHLACKER, P. (1975): Änderungen im Photosynthesemechanismus bei Anzucht homokontinuierlicher Kulturen von Scenedesmus in Stark- und Schwachlicht.
Dissertation Fachbereich Biologie, Marburg
- FOOTE, C.S. & WEXLER (1964): Olefin Oxidations with Excited Singlet Molecular Oxygen. J. Amer. Chem. Soc. 86, 3879.
- FOOTE, C.S. & DENNY, R.W. (1968): Chemistry of Singlet Oxygen VII: Quenching by β -Carotene J. Amer. Chem. Soc. 90, 6233.
- FOOTE, C.S., Y.C. CHANG & R.W. DENNY (1970): Chemistry of Singlet Oxygen X: Carotenoid Quenching Parallels Biological Protection. J. Amer. Chem. Soc. 92, 5216.
- FRICKEL-FAULSTICH, B. (1974): Veränderungen im photosynthetischen Elektronentransport einzelliger Grünalgen während des Entwicklungszyklus.
Dissertation im Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg/Lahn.
- GARNIER, J. and Maroc, J. (1971): Studies on the Electron Transport Chain of Three Non-Photosynthetic Mutants of Chlamydomonas reinhardtii.
Proc. Int. Congr. Photosynth. Res. 2nd 1971 pp. 669.

GOEDHEER, J.C. (1965): Fluorescence Action Spectra of Algae and Bean Leaves at Room and at Liquid Nitrogen Temperatures.
Biochim. Biophys. Acta 102, 73.

GOEDHEER, J.C. (1969): Energy Transfer from Carotenoids to Chlorophyll in Blue-Green, Red and Green Algae and Greening Bean Leaves.
Biochim. Biophys. Acta 172, 252.

GOEDHEER, J.C. (1970): On the Pigment System of Brown Algae
Photosynthetica 4, 97.

GOODWIN, T.W. (1974): Carotenoids and Biliproteins
In: Algal Physiology and Biochemistry
Ed. by Stewart, W.P.P., Blackwell Scientific Publications Oxford/London.

GOODWIN, T.W. (1976): Distribution of Carotenoids
In: Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments Ed. by T.W. Goodwin, Acad. Press
New York, London p. 225.

GOVINDJEE and PAPAGEORGIOU (1971): Chlorophyll Fluorescence and Photosynthesis: Fluorescence Transients. Photophysiol. VI Ed. by Giese A.C., Acad. Press New York/London p. 2.

GOVINDJEE and ZILINKAS BRAUN, B. (1974): Light Absorption, Emission and Photosynthesis.
In: Algal Physiology and Biochemistry
Ed. by Stewart, W.D.P. Blackwell Scientific Publications Oxford, London p 665.

GOVINDJEE and GOVINDJEE, R. (1975): Introduction to Photosynthesis. In: Bioenergetics of Photosynthesis Ed. by Govindjee, Acad. Press
New York, San Francisco, London p. 2

- GRIFFITHS, M., W.R. SISTROM, G. COHEN-BAZIRE & R.Y. STANIER (1955): Function of Carotenoids in Photosynthesis. *Nature* 176, 1211
- GRIMM, L.H. (1974): Die Carotinoid-Zusammensetzung von PS I und PS II Chlorella-Subchloroplastenpartikeln. *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* 87, 509.
- HAGER, A. & T. MEYER-BERTENRATH (1966): Die Isolierung und quantitative Bestimmung der Carotionide und Chlorophylle von Blättern, Algen und isolierten Chloroplasten mit Hilfe dünn-schichtchromatographischer Methoden. *Planta (Berl.)* 69, 198.
- HAGER, A. & MEYER-BERTENRATH (1967): Die Identifizierung der an Dünnschichten getrennten Carotinoide grüner Blätter und Algen. *Planta (Berl.)* 76, 149
- HAGER, A. & MEYER-BERTENRATH (1967): Beziehungen zwischen Absorptionsspektrum und Konstitution bei Carotinoiden von Algen und Höheren Pflanzen. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 80, 426
- HAGER, A. & H. STRANSKY (1970): Das Carotinoidmuster und die Verbreitung des lichtinduzierten Xanthophyllzyklus in verschiedenen Algenklassen. I. Methoden zur Identifizierung der Pigmente. *Arch. Mikrobiol.* 71, 152
- HAGER, A. und STRANSKY (1970 b): Das Carotinoidmuster und die Verbreitung des lichtinduzierten Xanthophyllzyklus in verschiedenen Algenklassen. III Grünalgen. *Arch. Microbiol.* 72, 68.
- HAGER, A. (1975): Die reversiblen, lichtabhängigen Xanthophyllumwandlungen im Chloroplasten. *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* 88, 27-41.

- HALL, D.O., EDGE, H. and KALINA, M (1971):
The Site of Ferricyanide Photoreduction in
the Lamellae of Isolated Spinach Chloroplasts:
A Cytochemical Study.
J. Cell Sci. 9, 289.
- HENNINGSSEN, K. and BOARDMAN, N.K., (1973):
Development of Photochemical Activity and
the Appearance of the High Potential Form
of Cytochrome b_{559} in Greening Barley
Seedlings. Plant Physiol. 51, 1117.
- HERRON, H.A. und MAUZERALL, D. (1972): The Develop-
ment of Photosynthesis in a Greening Mutant
of Chlorella and an Analysis of the Light
Saturation Curve. Plant Physiol. 50, 141-148.
- HOFER, I., STRASSER, R.J. and SIRONVAL, C. (1974):
The Polypeptide Pattern of Fractions Isolated
from Normal Thylacoids and from Primary
Thylacoids Before and After Induction of the
Ability to Evolve Oxygen.
Proc. Int. Congr. Photosynth. Res. 3rd 1974
p, 1685.
- HOWES, C.D. (1974): Nicotine Inhibition of Caro-
tenoid Cyclization in Cucurbita Ficifolia
Cotyledons. Photochem. 13, 1469-1471.
- JEFFREY, S.W. (1968): Quantitative Thin-Layer
Chromatography of Chlorophylls and Carotenoids
from Marine Algae. Biochim. Biophys. Acta,
162, 271.
- KAN, K.S. and THORNBUR, J.P. (1976): The Light-
Harvesting Chlorophyll a/b-Protein Complex
of Chlamydomonas reinhardtii.
Plant Physiol. 57 47-52.

KNAFF, D.B. and ARNON, D.I. (1969):

Spectral Evidence for a New Photoreactive Component of the Oxygen Evolving System in Photosynthesis.

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 63, 963.

KOREN, A. and EPEL, B.C (1976): The Role of Chlorophyll b in Energy Transfer from Carotenoid to Photosystem I.

VII. Intern. Congr. in Photobiol. Rom /P 72.

KRATZ, W.A. & MYERS, J. (1955): Nutrition and Growth of Several Blue-Green Algae.

Amer. J. Bot. 42, 282-287.

KRINSKI, N.J. (1966):

The Role of Carotenoid Pigments as Protective Agents against Photosensitized Oxidations in Chloroplasts.

In: Biochemistry of Chloroplasts I, 423-430

Ed. by T.W. Goodwin, Academic Press, New York.

KRINSKI, N.J. (1968): The Protective Function of Carotenoid Pigments.

In: Photophysiology III

Ed. by A.C. Giese; Academic Press New York, London p 123.

KRINSKI, N.J. (1971): IX Function. In :Carotenoids

Ed. by O. Isler., Birkhäuser Verl. Basel p. 669.

KUHL, A and LORENZEN, H. (1964): Handling and Culturing of Chlorella.

In: Methods of Cell Physiol., Vol II

Ed. by D.M. Prescott, Academic Press, New York and London, p. 159.

KULANDAIVELU, G. and SENGER, H. (1976):

The 520 nm Absorbance Change in Scenedesmus obliquus and its Relation to PS I.

Biochim. Biophys. Acta 450, 94.

- LOZIER, H. and BUTLER, W.L. (1972): The Effects of Dibromothymoquinone on Fluorescence and Electron Transport of Spinach Chloroplasts. FEBS Lett. 26, 161-164.
- MAC KINNEY, G. (1941): Absorption of Light by Chlorophyll Solutions. J. Biol. Chem. 140, 315.
- MAGOON, E.F. and L. ZECHMEISTER (1957): On a cis-Neurosporene ex *Pyracantha* and the in vitro Stereoisomerization of Neurosporene Arch. Biochem. Biophys. 68, 263.
- MELL, V. (1974): Herstellung und Funktion subzellulärer, photosynthetisch aktiver Partikel an einzelligen Grünalgen. Staatsexamensarbeit, Marburg.
- MELL, V. (1976): Aktivitätsuntersuchungen an Chloroplastenpartikeln und Subchloroplastenpartikeln aus synchronisierten Zellen von *Scenedesmus obliquus*. Diss. Univ. Marburg.
- OELZE-KAROW, H. and BUTLER, W.L. (1971): The Development of Photophosphorylation and Photosynthesis in Greening Bean Leaves. Plant Physiol. 48, 621-625.
- OKAYAMA, S. and BUTLER, W.L. (1972): Extraction and Reconstitution of Photosystem II. Plant Physiol. 49, 769-774.
- POWLS, R. (1971): A Carotenoid-Deficient Mutant Strain of *Scenedesmus obliquus* with Defective Chloroplast Lamellae. Proc. Int. Congr. Photosynth. Res. 2nd, 1971 p 2611.

SAPOZHNIKOV, D.J., ALKHAZOV, D.G., FIDELMAN, Z.M.,
BAZHANOVA, N.V., LEMBERG, J.K., MASLOVA, T.G.
GIRSHIN, A.B., POPOVA, J.A. SAAKOV, V.S.,
POPOVA, O.F. and SHIRYEVA, G.A. (1961):
The Assimilation of ^{18}O from Heavy-Oxygen
Water into Violaxanthin when the Plant is
Exposed to the Action of Light.
Bot. Zhur. 46, 673.

SCHÄFER, M (1975): ATP-Pool-Bestimmungen und
Konformationsänderungen während des Entwick-
lungsverlaufes von *Scenedesmus obliquus* in
Synchronkulturen.
Dissertation im F.B. Biologie der
Philipps-Universität Marburg.

SELMAN, B.R. and BANNISTER, T.T. (1971):
Trypsin Inhibition of Photosystem II Electron
Transport.
Proc. Int. Congr. Photosynth. Res. 2nd, 1971,
p. 577.

SENGER, H. (1968): Änderungen im Photosyntheseme-
chanismus während des Entwicklungszyklus
synchron wachsender Grünalgen.
Habilitationsschrift der Naturwiss. Fakultät
der Philipps-Univ. Marburg.

SENGER, H., PFAU, J. and WERTHMÜLLER, K. (1972):
Continuous Automatic Cultivation of Homocon-
tinuous and Synchronized Microalgae.
In: Methods in Cell Physiol. Vol V, Ed by
San Pietro, Academic Press, Inc. New York
and London pp 301-323.

SENGER, H. (1972): Quantum Yield of Photosynthesis
and the Emerson Enhancement Effect.
Proc. Int. Congr. Photosynth. Res. 2nd, 1971
p. 723.

SENGER, H. and BISHOP, N.I. (1972):

The Development of Structure and Function
in Chloroplasts of Greening Mutants of
Scenedesmus.

I. Formation of Chlorophyll.

Plant and Cell Physiol. 13:633-649.

SENGER, H. BISHOP, N.I., WEHRMEYER, W. and

KULANDAIVELU, G. (1974): Development of
Structure and Function of the Photosynthetic
Apparatus During Light Dependent Greening
of a Mutant of *Scenedesmus obliquus*.

Proc. Int. Congr. on Photosynth. Res. 3rd 1974
p 1913.

SENGER, H. and MELL, V. (1977): Preparation of

Photosynthetically Active Particles from
Synchronized Cultures of Unicellular Algae.
(in press).

SIGALAT, C and DE KOUCHKOVSKY, Y. (1974):

Preparation and Properties of Photosynthetic
Fragments of the Unicellular Blue-Green Alga
Anacystis nidulans.

Proc. Int. Congr. Photosynth. Res. 3rd 1974
p 621.

STANIER, R.Y. (1959): Formation and Function of
the Photosynthetic Pigment System in Purple
Bacteria.

Brookhaven Symp. 11,45

STERN, A.I., EPSTEIN, H.T. and SCHIFF, J.A. (1964):

Studies of Chloroplast Development in *Euglena*
VI Light Intensity as a Controlling Factor
in Development.

Plant Physiol. 39, 226.

- STRICHARTZ, G.R. and CHANCE, B. (1972):
Absorbance Change at 520 nm Caused by
Salt Addition to Chloroplast Suspensions
in the Dark.
Biochim. Biophys. Acta 256, 71
- THORNER, I.P. (1975): Chlorophyll Proteins.
Light-Harvesting and Reaction Center Components
of Plants.
Ann. Rev. Plant Physiol. 26, 127-158.
- TREBST, A. und HAUSKA, G. (1974): Energiekonser-
vierung in der photosynthetischen Membran der
Chloroplasten.
Naturwiss. 61, 308-316.
- VAISBERG, A.J. and SCHIFF, J.A. (1976):
Events Surrounding the Early Development
of Euglena Chloroplast.
7. Inhibition of Carotenoid Biosynthesis by
the Herbicide SAN9789 (4-Chloro-5-(methylamino)
-2-(α,α,α -trifluoro-m tolyl)-3-(2H) pyridazinone
and its Developmental Consequences.
Plant Physiol. 57, 260.
- VERNON, L.P., SHAW, R.R., OGAWA, T. and RAVEED, P.
(1971): Structure of Photosystem I and Photo-
system II of Plant Chloroplasts.
Photochem. and Photobiol. 14, 343.
- WALLES, B. (1965):
Use of Biochemical Mutants in Analysis of Chlo-
roplast Morphogenesis.
In : Biochemistry of Chloroplasts II.
Ed. by T.W. Goodwin, Academic Press, London and
New York p. 633.
- WESSELS, S.C., Van ALPHEN - Van WAVEREN, O. and
VOORN, G. (1973): Isolation and Properties of
Particles Containing the Reaction Center Com-
plex of Photosystem II from Spinach Chloroplasts.
Biochim. Biophys. Acta 292, 741

WILLIAMS, J.L. (1971): A Study on the Carotenoids of Wild-Type and Mutant Strains of the Alga Scenedesmus obliquus.

Masters Thesis, Oregon University USA

WOLFF, Ch. And WITT, H.T. (1969): On Metastable States of Carotenoids in Primary Events of Photosynthesis.

Z. Naturforsch. 24 b 1031.

ZECHMEISTER, L., LE ROSEN, A.L. SCHROEDER, W.A.,

POLGAR, A. and LINUS PAULING (19437:

Spectral Characteristics and Configuration of Some Stereoisomeric Carotenoids Including Prolycopene and Pro- β -Carotene.

J. Amer. Chem. Soc. 65, 1540

ZECHMEISTER, L. & PINCKARD, J.H. (1947): Some

Poly-cis Lycopenes Occuring in the Fruit of Pyracantha

J. Amer. Chem. Soc. 69, 1930.

ZECHMEISTER, L. & KENNETH KOE (1954): Stepwise

Dehydrogenation of the Colorless Polyenes

Phytoene and Phytofluene with N-Bromosuccinimide to Carotenoid Pigments.

METZNER, H., RAU, H. und SENGER, H. (1965):

Untersuchungen zur Synchronisierbarkeit einzelner Pigmentmangel-Mutanten von Chlorella. Planta (Berl.) 65, 186.

Die vorliegende Arbeit entstand im Fachbereich
Biologie-Botanik der Philipps-Universität
Marburg/Lahn.

Herrn Prof. Dr. H. Senger danke ich für die Themen-
stellung, die intensive Betreuung der Arbeit und
die massive Unterstützung bei der Beseitigung von
Engpässen, wodurch es vor allem ermöglicht wurde,
die Arbeit in der verfügbaren Zeit abzuschließen.

Mein Dank gilt ebenfalls Herrn V. Mell für zahl-
reiche Diskussionen während der Arbeit und die
intensive Zusammenarbeit bei der Partikel-Prä-
paration. Herrn Dr. R. Powls danke ich für die
zahlreichen anregenden Diskussionen über den Pro-
blembereich der Carotinoide.

Weiterhin danke ich Frau G. Müller für die Be-
treuung der Algenkulturen. Frau A. Altmann, Frau
I. Koss und Herrn A. Geiger danke ich für die Mit-
hilfe bei der Durchführung einiger Experimente;
und Herrn H. Becker für die graphische Darstellung
der Ergebnisse.

Insbesondere bei Frau I. Krieger, jedoch auch bei
Frau M. Kirschstein und Frau E. Mell-Aust möchte
ich mich für ihren Einsatz bei der schriftlichen
Fixierung der Arbeit bedanken und schließlich
danke ich allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Senger
sowie den Angehörigen des FB Biologie, die mich
während meiner Arbeit unterstützt haben.

Der Studienstiftung des Deutschen Volkes danke ich
für die Gewährung eines Graduiertenstipendiums zur
Promotionsförderung, wodurch mir ein weiterführendes
Studium ermöglicht wurde.

LEBENS LAUF

- 24.1.1944** geboren in Potsdam als Sohn des Oberzahlmeisters Herbert Straßberger und seiner Ehefrau Käthe, geb. Völkel
- 1950 - 1958** Besuch der Volksschulen Pivitsheide V.H. und Heidenoldendorf bei Detmold (NRW)
- 1958 - 1961** Bäckerlehre bei Herrn G. Heidsiek in Detmold
- 1961 - 1963** Konditorlehre bei Herrn W. Merk, Bielefeld
- 1964 - 1966** Besuch der Berufsaufbauschule der Carl Severing-Berufsschule Bielefeld, Abschluß: Mittlere Reife
- 1966 - 1968** Besuch des Westfalen-Kollegs Bielefeld (Institut zur Erlangung der Hochschulreife) Abschluß: Abitur
- 1968 - 1975** Studium der Fächer Biologie und Chemie an der Philipps-Universität Marburg/L
- Januar 1975** Wissenschaftliche Prüfung für das Höhere Lehramt (Staatsexamen)
- Ab Februar 1975** Anfertigung einer Dissertation am FB Biologie (17) der Philipps-Universität Marburg/L

Meine akademischen Lehrer waren:

Berndt, Bertsch, Bock, Bohnsack, Buchholtz,
Cleffmann, Dehnicke, Diederich, Dimroth,
Fischer, Follmann, Geyer, Henßen, Kellner,
Kessel, Kindl, Kirchner, Klafky, Koch,
Koecke, Kowallik, Lenski, Lütke, Müller,
Nöth, Nultsch, Pfeil, Remane, Schmidt,
Schönbohm, Scriba, Seidelmann, Seitz, Senger,
v. Stosch, Walcher, Wehrmeyer, Werner.

City Schnelldruck, Marcusstraße 10, 8700 Würzburg